

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393318** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2024.03.25(22) Дата подачи заявки
2021.07.29

(51) Int. Cl. *C07C 271/22* (2006.01)
C07C 235/78 (2006.01)
C07C 237/12 (2006.01)
C07C 235/20 (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)
A61K 47/60 (2017.01)
A61K 38/27 (2006.01)
A61P 5/06 (2006.01)

(54) **НЕПРИРОДНАЯ АМИНОКИСЛОТА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ, СОДЕРЖАЩИЙ ЕЕ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК И КОНЬЮГАТ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА**

(86) PCT/CN2021/109276

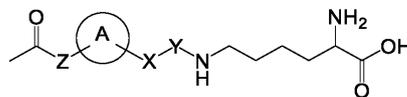
(87) WO 2023/004686 2023.02.02

(71) Заявитель:
**НОВОКОДЕКС
БИОФАРМАСЬЮТИКАЛС КО., ЛТД.
(CN)**

(72) Изобретатель:
**Ян Цзиньвэй, Е Чэнхао, Ся Ган, Хо
Пэнчао, Дин Вэнь, Чэнь Лунфэй,
Цзяо Линь, Хуан Хао, Хэн Синь,
Чжу Цзинцзин, Ин Юэбинь, Лян
Сюэцзюнь (CN)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к не природной аминокислоте, которая представляет собой соединение со структурой, представленной формулой (I), или его энантиомер. Согласно настоящему изобретению также предложено применение не природной аминокислоты. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный белок, содержащий не природную аминокислоту, и белковый конъюгат, полученный из указанного рекомбинантного белка. Не природная аминокислота, предложенная согласно настоящему изобретению, проста и удобна для получения, безопасна, не инактивируется легко при инсерции в белок и имеет высокий коэффициент связывания с фрагментом для сопряжения, а полученный конъюгат более стабилен. Не природная аминокислота, предложенная согласно настоящему изобретению, подходит для применения во многих областях, в частности при получении рекомбинантного белка или конъюгата рекомбинантного белка,

**A1****202393318****202393318****A1**

НЕПРИРОДНАЯ АМИНОКИСЛОТА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ, СОДЕРЖАЩИЙ ЕЕ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК И КОНЬЮГАТ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

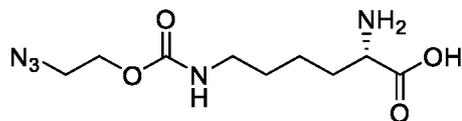
ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится к области биофармацевтических средств и, в частности, к неприродной аминокислоте, рекомбинантному белку, содержащему такую неприродную аминокислоту, и конъюгату, образованному с указанным рекомбинантным белком.

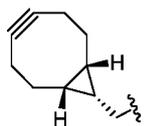
УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

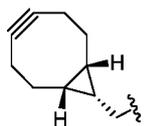
10 Проведение различных научных исследований и разработку способов применения продуктов можно осуществлять путем введения в белки не встречающихся в природе аминокислот, содержащих специальные группы. Например, для изучения взаимодействия между белками подходит введение в белки фоточувствительных неприродных аминокислот или специальное мечение неприродных аминокислот. Другим примером являются неприродные аминокислоты, которые применяют для направленной эволюции ферментов для улучшения активности или стабильности указанных ферментов или для облегчения эффективной иммобилизации указанных ферментов. Другой пример: можно получать безопасные живые бактериальные или живые вирусные вакцины путем инсерции неприродных аминокислот, которую невозможно реализовать в стандартных хозяевах. Важное применение технологии экспансии кодонов при введении неприродных аминокислот в белки заключается в сайт-специфической модификации белков, которая может улучшать функцию, стабильность и период полужизни белков, и может быть использована для разработки инновационных биологических лекарственных средств. К 20 настоящему времени достигнуты некоторые успехи, такие как получение рекомбинантных белков длительного действия из сайт-специфически сопряженных с ПЭГ рекомбинантных гормонов роста человека, разработка конъюгатов антитело-лекарственное средство из сайт-специфически сопряженных с низкомолекулярным токсином моноклональных антител и т.п. Таким образом, очевидно, что неприродные аминокислоты играют очень важную роль и 30 имеют очень широкий спектр применения.

Из уровня техники (например, CN 102838671B, CN 106146663A и *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8720) известна неприродная аминокислота азидолизин (Lys-азидо), имеющая следующую структурную формулу:



Азидная структура (-N₃) на конце Lys-азидо может быть химически связана с носителем лекарственного средства (таким как ПЭГ), модифицированным алкинсодержащей



5 структурой (такой как BCN, т.е. ) с получением конъюгата (например, см. китайский патент CN 103153927B), который обладает очень высокой специфической селективностью. Однако этот способ сопряжения и способ химической модификации подразумевает введение дорогостоящих алкиновых структур, и приемлемый коэффициент сопряжения лекарственного средства: антитела может быть получен только при
10 использовании алкиновых структур в количестве, превышающем эквивалентное, что увеличивает соответствующие производственные затраты, и требует использования сложного технологического процесса и строгих технологических условий.

Поэтому необходимо разработать неприродную аминокислоту с новой структурой, простую для получения, с низкой стоимостью, чтобы расширить типы и варианты
15 применения аминокислот.

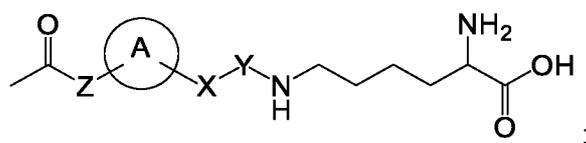
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Одной из задач настоящего изобретения является обеспечение неприродной аминокислоты для преодоления недостатков предшествующего уровня техники.

20 Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение применения указанной неприродной аминокислоты.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение рекомбинантного белка и конъюгата рекомбинантного белка.

Неприродная аминокислота, предложенная согласно настоящему изобретению,
25 представляет собой соединение со структурой, представленной формулой (I), или его энантиомер,

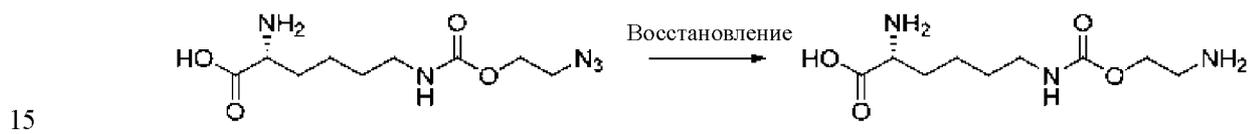


I

где X и Z каждый независимо представляет собой замещенный или незамещенный C0-C20 линейный или разветвленный алкилен, один или более -CH₂- необязательно замещен(ы) одним или более из -O-, -S-, -NH-, -C(O)- и -S(O)-, Y представляет собой -C(O)-, -S(O)- или -CH₂-, и A представляет собой замещенный или незамещенный C6-C20 арил; и

5 если каждый X, Z и A каждый независимо представляет собой заместитель, указанный заместитель может быть выбран из одного или более из гидроксила, сульфгидрила, галогена, нитро, циано, алкила, алкенила, алкинила, алкокси, ацила, ациламино, карбоксила, сложного эфира, amino, сульфонила, сульфинила, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

10 Как показано в примере 11, автор настоящего изобретения обнаружил, что азидная структура (-N₃) на конце Lys-азидо, характеризующаяся высокой стоимостью и сложностью процесса, кроме того, легко восстанавливалась до аминокислотной структуры (-NH₂) после инсерции азидной структуры в белок, утрачивая таким образом способность к сопряжению; соответственно, реакция восстановления снижает выход в технологическом процессе получения.



20 На конце неприродной аминокислоты, предложенной согласно настоящему изобретению, вводят карбонил в качестве активной реакционной группы, так что указанная неприродная аминокислота не только является новой по структуре, простой и удобной для получения, но также характеризуется мягкими условиями сопряжения и низкой себестоимостью, и, благодаря структурному изменению, не склонна легко утрачивать реакционную активность после инсерции в последовательность белка. Неприродная аминокислота, предложенная согласно настоящему изобретению, дополнительно содержит арил, соединенный с концевым карбонилем, введение арила может дополнительно улучшать стабильность полученного конъюгата, и указанный конъюгат не разлагается легко даже при

25 более низких значениях pH. Кроме того, неприродная аминокислота согласно настоящему изобретению дополнительно содержит алкилен с определенной длиной цепи, так что соединение обладает большей гибкостью и легче образует различные конъюгаты.

В неприродной аминокислоте, предложенной согласно настоящему изобретению, "C0-Cn" включает C0-C1, C0-C2, ..., C0-Cn, и C0 указывает на то, что группа не существует, и атомы C на двух концах группы непосредственно соединены с образованием связи. Например, группа «C0-C6» подразумевает, что в этой части содержится от 0 до 6 атомов углерода, что означает, что: группа не существует, группа содержит 1 атом углерода, 2 атома углерода, 3 атома углерода, 4 атома углерода, 5 атомов углерода или 6 атомов углерода. Группа «C6-C10» подразумевает, что в этой части содержится от 6 до 10 атомов углерода,

что означает, что группа содержит 6 атомов углерода, 7 атомов углерода, 8 атомов углерода, 9 атомов углерода или 10 атомов углерода.

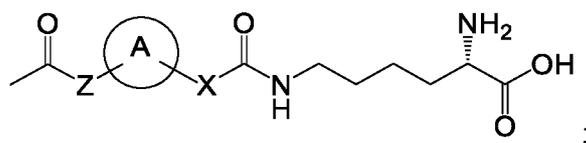
В неприродной аминокислоте, предложенной согласно настоящему изобретению, «арил» относится к карбоциклической ароматической системе, содержащей одно или два кольца, при этом кольца могут быть соединены между собой путем конденсирования. «Арил» включает моноциклический или бициклический арил, такой как ароматические группы фенила, нафтила и тетрагидронафтила. Предпочтительно арил представляет собой С6-С10 арил, более предпочтительно арил представляет собой фенил и нафтил, и наиболее предпочтительно арил представляет собой фенил.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения заместитель может быть выбран из одного или более из гидроксила, сульфгидрила, галогена, нитро, циано, С1-С6 алкила, С1-С6 алкокси, ацила, ациламино, карбоксила, сложного эфира, amino, сульфонила, сульфинила, С3-С8 циклоалкила, С3-С8 гетероциклила, С6-С20 арила и С4-С10 гетероарила.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения каждый из X и Z может независимо представлять собой линейный или разветвленный алкилен С0-С10, причем один или более -СН₂- может быть необязательно замещен одним или более из -О-, -S- и -NH-. В некоторых более предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения каждый из X и Z может независимо представлять собой С0-С6 линейный алкилен, где один или более -СН₂- может быть необязательно замещен одним или более из -О-, -S- и -NH-. В некоторых более предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения X и Z не являются С0-алкиленом одновременно, что означает, что X и Z группы не могут существовать одновременно.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения А может представлять собой замещенный или незамещенный С6-С10 арил, и более предпочтительно А может представлять собой замещенный или незамещенный фенил или нафтил.

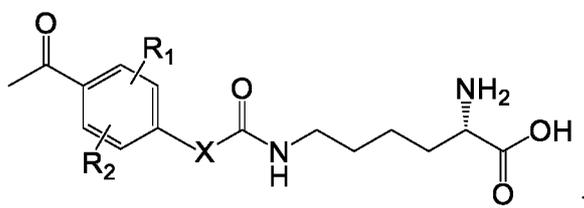
В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения неприродная аминокислота может представлять собой соединение со структурой, представленной формулой (I-1),



где каждый из X, Y и A независимо соответствует определению, приведенному в любом

из описанных выше технических решений.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения неприродная аминокислота может представлять собой соединение со структурой, представленной формулой (I-2),



I-2

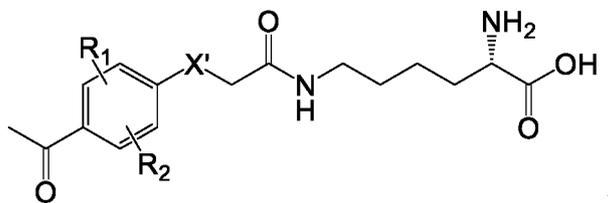
где X соответствует определению, приведенному в любом из описанных выше технических решений; и

каждый из R₁ и R₂ независимо представляет собой водород, гидроксил, сульфгидрил, галоген, нитро, циано, C1-C6 алкил, C1-C6 алкокси, ацил, ациламино, карбоксил, сложный эфир, amino, сульфонил, сульфинил, C3-C8 циклоалкил, C3-C8 гетероцикл, C6-C20 арил или C4-C10 гетероарил.

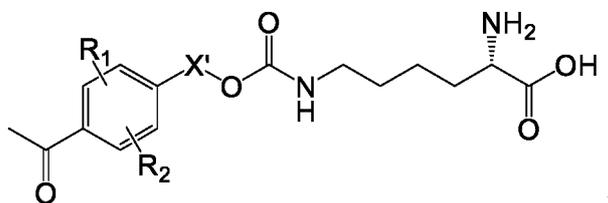
10

В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения неприродная аминокислота представляет собой соединение со структурой, представленной формулой (I-3), формулой (I-4), формулой (I-5) или формулой (I-6),

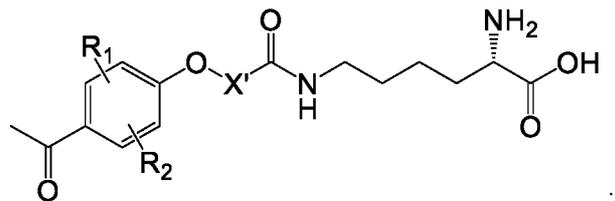
15



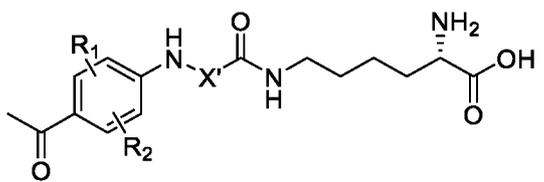
I-3



I-4



I-5



I-6

- 5 где X' представляет собой C0-C6 линейный алкилен и более предпочтительно представляет собой C0-C4 линейный алкилен, и один или более -CH₂- необязательно замещены -O- и/или -NH-; и

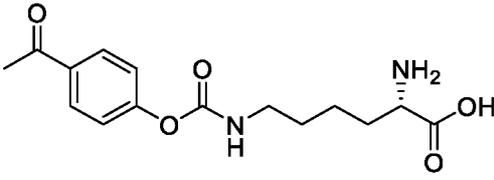
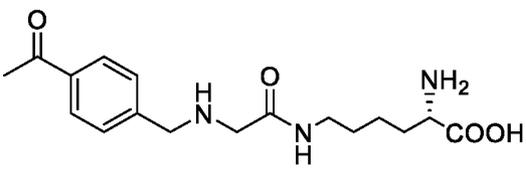
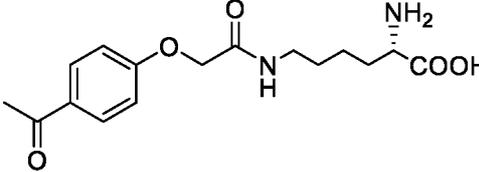
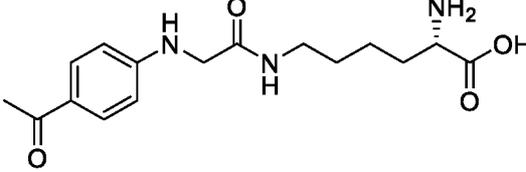
каждый из R₁ и R₂ независимо соответствует определению, приведенному в любом из описанных выше технических решений.

- 10 Неприродная аминокислота согласно настоящему изобретению включает оптически чистый энантиомер и рацемат.

В некоторых более предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения неприродная аминокислота, предложенная согласно настоящему изобретению, представляет собой соединение, имеющее одну из следующих структур:

15

(1) NВОК	
(2) NПАК	
(3) NВРК	

(4) NPOK	
(5) NBGK	
(6) NPOK-2	 <p style="text-align: right;">или</p>
(7) NBGK-2	

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение неприродной аминокислоты согласно любому из описанных выше технических решений для получения рекомбинантного белка или конъюгата рекомбинантного белка.

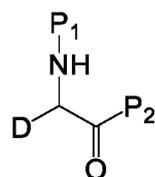
5 При использовании согласно настоящему изобретению рекомбинантный белок может представлять собой рекомбинантный белок, полученный путем инсерции неприродной аминокислоты в соответствии с любым из приведенных выше технических решений в любой тип белка, обычного в данной области техники, в любой сайт и в любом количестве. Рекомбинантный белковый конъюгат может представлять собой конъюгат, полученный

10 путем сопряжения с любым рекомбинантным белком, полученным с фрагментом для сопряжения, обычным в данной области техники, при этом указанный фрагмент для сопряжения может включать, не ограничиваясь перечисленным, один или более полимеров (таких как полиэтиленгликоль с любой молекулярной массой), белков, полипептидов или одно или более низкомолекулярных лекарственных средств.

15 В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный белок может представлять собой рекомбинантный гормон роста человека, а конъюгат рекомбинантного белка может представлять собой конъюгат рекомбинантного гормона роста человека и полиэтиленгликоля.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен рекомбинантный белок, отличающийся тем, что по меньшей мере один сайт в последовательности аминокислот указанного рекомбинантного белка представляет собой неприродную аминокислоту в соответствии с любым из описанных выше технических решений.

5 Кроме того, рекомбинантный белок может иметь структуру, представленную формулой (II),



II

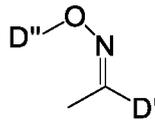
10 в формуле (II) D представляет собой остаток неприродной аминокислоты в соответствии с любым из описанных выше технических решений с удаленной частью – аминокарбоновой кислотой, а P₁ и P₂, соответственно, представляют собой соединительные части аминогруппы и карбоксильной группы неприродной аминокислоты в последовательности аминокислот.

15 Рекомбинантный белок, предложенный согласно настоящему изобретению, может быть получен с помощью способа получения, обычного в данной области техники, включая осуществление клонирования и экспрессии рекомбинантного белка, содержащего неприродную аминокислоту, с помощью технологии экспансии генных кодонов.

20 Рекомбинантный белок, предложенный согласно настоящему изобретению, может представлять собой рекомбинантный белок, полученный путем инсерции неприродной аминокислоты в соответствии с любым из описанных выше технических решений, в любой тип белка, обычный в данной области техники, такой как рекомбинантный гормон роста человека, в любой сайт и в любом количестве.

25 Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен конъюгат рекомбинантного белка, отличающийся тем, что указанный конъюгат рекомбинантного белка образуется посредством оксимной связи между концевым карбонилем неприродной аминокислоты в указанном рекомбинантном белке, соответствующем любому из указанных выше технических решений, и связывающим фрагментом, содержащим концевую группу "NH₂-O-".

30 Далее, конъюгат рекомбинантного белка может иметь структуру, представленную формулой (III),



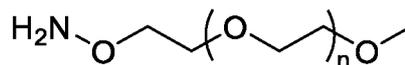
III

в формуле (III) D' представляет собой остаток рекомбинантного белка согласно любому из описанных выше технических решений с удаленной концевой карбонильной частью
 5 неприродной аминокислоты, а D'' представляет собой остаток фрагмента для сопряжения с удаленной концевой группой "NH₂-O-".

В конъюгате рекомбинантного белка, предложенном согласно настоящему изобретению, фрагмент для сопряжения может включать один или более полимеров (таких как полиэтиленгликоль с любой молекулярной массой), белков, полипептидов, или одно или
 10 более низкомолекулярных лекарственных средств. Различные виды фрагментов для сопряжения могут быть по отдельности сопряжены с рекомбинантным белком, или различные виды фрагментов для сопряжения могут быть сначала соединены, а затем сопряжены с рекомбинантным белком.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения
 15 рекомбинантный белок может представлять собой рекомбинантный гормон роста человека, а фрагмент для сопряжения, содержащий концевую группу "NH₂-O-", может представлять собой полиэтиленгликоль, содержащий концевую группу "NH₂-O-".

В некоторых более предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения полиэтиленгликоль, содержащий концевую группу «NH₂-O-», имеет следующую
 20 структурную формулу:



где молекулярная масса полиэтиленгликоля, содержащего концевую группу "NH₂-O-", может составлять от 10 кДа до 100 кДа, включая, но не ограничиваясь перечисленными, значения молекулярной массы около 10 кДа, 20 кДа, 30 кДа, 40 кДа, 50 кДа, 60 кДа, 70 кДа,
 25 80 кДа, 90 кДа и 100 кДа, или любую комбинацию диапазонов молекулярных масс. Предпочтительно молекулярная масса полиэтиленгликоля, содержащего концевую группу "NH₂-O-", может составлять от 20 кДа до 50 кДа.

Согласно некоторым более предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения последовательность аминокислот рекомбинантного гормона роста человека
 30 соответствует приведенной в SEQ ID NO: 1; и, более предпочтительно, соответствующий 107-й сайт в последовательности аминокислот SEQ ID NO: 1 представляет собой неприродную аминокислоту согласно любому из описанных выше технических решений.

Если рекомбинантный белок представляет собой рекомбинантный гормон роста

человека, согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение конъюгата рекомбинантного белка в соответствии с любым из описанных выше технических решений для получения лекарственного средства для лечения нарушений роста и развития, вызванных недостаточностью секреции эндогенного гормона роста, нарушений роста и развития, вызванных синдромом Тернера или дефицитом гормона роста у взрослых.

Технические решения, которые обеспечивает настоящее изобретение, имеют следующие преимущества.

(1) Концевой карбонил и арил, соединенный с концевым карбонилем, вводят в структуру неприродной аминокислоты, предложенной согласно настоящему изобретению; по сравнению с существующей неприродной аминокислотой с концевой азидной группой (такой как Lys-азидо), указанная неприродная аминокислота проста и удобна для получения, имеет хороший уровень безопасности, не является легко инактивируемой при inserции в белок и обладает высоким показателем связывания с фрагментом для сопряжения, а полученный конъюгат более стабилен.

(2) В качестве производного аминокислоты неприродная аминокислота, предложенная согласно настоящему изобретению, может обладать свойствами аминокислоты, тем самым расширяя потенциальные типы аминокислот, соответственно, указанная неприродная аминокислота может применяться во многих областях в качестве производного аминокислоты, в частности, при получении рекомбинантного белка или конъюгата рекомбинантного белка.

(3) Неприродная аминокислота, предложенная согласно настоящему изобретению, может быть успешно распознана в прокариотической системе экспрессии и эукариотической системе экспрессии и inserтирована в белок, с продуцированием таким образом белка, содержащего неприродную аминокислоту в конкретном сайте, благодаря чему могут быть получены рекомбинантные белки с различными физическими и химическими свойствами и биохимической активностью, а также расширены типы и потенциальные области применения белков. Кроме того, неприродная аминокислота согласно настоящему изобретению обладает более высокой эффективностью экспрессии белка и лучшей применимостью.

(4) Поскольку рекомбинантный белок, предложенный согласно настоящему изобретению, содержит неприродную аминокислоту согласно настоящему изобретению, концевая карбонильная активная группа, содержащаяся в неприродной аминокислоте, может легко образовывать сопряженный белок (или белковый конъюгат), такой как конъюгат с полиэтиленгликолем и конъюгат с полиэтиленгликолем и активным лекарственным средством. Эти белковые конъюгаты могут обладать улучшенными характеристиками многих видов биологической активности (такой как противоопухолевая активность)

благодаря модификации свойств.

(5) Согласно настоящему изобретению также предложена новая платформа для конъюгации белков, и множество типов белков и множество типов фрагментов для сопряжения могут быть связаны с использованием новой неприродной аминокислоты, содержащейся в белке, и присоединенного фрагмента для сопряжения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1 представляет собой профиль экспрессионной плазмиды рЕТ21-rhGH107 для рекомбинантного гормона роста человека из примера 8.

Фиг. 2 представляет собой ДСН-ПААГ-электрофореграмму продуктов ферментации, полученных путем добавления различных типов неприродных аминокислот из примера 8, где, соответственно, различные дорожки представлены следующими: Дорожка 1: маркер молекулярной массы белка; дорожка 2: рекомбинантный гормон роста человека дикого типа; дорожка 3: продукт экспрессии рекомбинантного гормона роста человека с добавлением NВОК; дорожка 4: продукт экспрессии рекомбинантного гормона роста человека с добавлением NРАК; дорожка 5: продукт экспрессии рекомбинантного гормона роста человека с добавлением NВРК; дорожка 6: продукт экспрессии рекомбинантного гормона роста человека с добавлением NВГК; дорожка 7: продукт экспрессии рекомбинантного гормона роста человека с добавлением NРОК; дорожка 8: продукт экспрессии рекомбинантного гормона роста человека с добавлением NРОК-2; дорожка 9: продукт экспрессии рекомбинантного гормона роста человека с добавлением NВГК-2; и дорожка 10: продукт экспрессии рекомбинантного гормона роста человека без добавления какой-либо неприродной аминокислоты.

Фиг. 3 представляет собой ДСН-ПААГ-электрофореграмму продуктов сопряжения рекомбинантного гормона роста человека, содержащего неприродную аминокислоту, сопряженную с ПЭГ, из примера 8, где различные дорожки, соответственно, представлены следующими: Дорожка 1: маркер молекулярной массы; дорожка 2: рекомбинантный гормон роста человека дикого типа; дорожка 3: продукт сопряжения рекомбинантного гормона роста человека, содержащего NВОК, сопряженный с ПЭГ; дорожка 4: продукт сопряжения рекомбинантного гормона роста человека, содержащего NРАК, сопряженный с ПЭГ; дорожка 5: продукт сопряжения рекомбинантного гормона роста человека, содержащего NВРК, сопряженный с ПЭГ; дорожка 6: продукт сопряжения рекомбинантного гормона роста человека, содержащего NВГК, сопряженный с ПЭГ; дорожка 7: продукт сопряжения рекомбинантного гормона роста человека, содержащего NРОК, сопряженный с ПЭГ; и дорожка 8: продукт сопряжения рекомбинантного гормона роста человека, содержащего NРОК-2, сопряженный с ПЭГ.

Фиг. 4 представляет собой ДСН-ПААГ-электрофореграмму очищенных ПЭГ-сопряженных рекомбинантных гормонов роста человека из примера 8, где различные дорожки, соответственно, представляют собой следующие: Дорожка 1: маркер молекулярной массы; дорожка 2: стандартный продукт рекомбинантного гормона роста человека; дорожка 3: продукт сопряжения рекомбинантного гормона роста человека, содержащего NPOK, сопряженный с ПЭГ; и дорожка 4: продукт сопряжения рекомбинантного гормона роста человека, содержащего NBOK, сопряженный с ПЭГ.

Фиг. 5А – фиг. 5G представляют собой кривые клеточной активности из примера 8, где фиг. 5А представляет собой кривую клеточной активности стандартного продукта rhGH (рекомбинантного гормона роста человека) Национальных институтов по контролю за продуктами и лекарственными средствами; фиг. 5В представляет собой кривую клеточной активности Джинтропина®; фиг. 5С представляет собой кривую клеточной активности пегилированного рекомбинантного соматропина человека для инъекций (Polyethylene Glycol Recombinant Human Somatropin Injection®); фиг. 5D представляет собой кривую клеточной активности rhGH (NPOK); фиг. 5Е представляет собой кривую клеточной активности ПЭГ-сопряженного гормона роста человека ПЭГ-rhGH (NPOK); фиг. 5F представляет собой кривую клеточной активности rhGH (NBOK); и фиг. 5G представляет собой кривую клеточной активности ПЭГ-rhGH (NBOK).

Фиг. 6 представляет собой флуоресцентную микрофотографию клеток СНО, транзистентно экспрессирующих инсертированные неприродные аминокислоты из примера 9.

Фиг. 7 представляет собой профиль экспрессионной плазмиды pCDNA3.1-трастузумаб-УАG142 из примера 10.

Фиг. 8А–8С представляют собой, соответственно, ГФХ-ВЭЖХ-спектры трастузумаба, содержащего NBRK, трастузумаба, содержащего NBOK, и трастузумаба, содержащего NPOK-2, сопряженного с токсином из примера 10.

Фиг. 9 представляет собой график ингибиторного действия трастузумаба, содержащего NBOK, и DM1-модифицированного трастузумаба, содержащего NBOK, на клетки ВТ-474, соответственно, из примера 10.

Фиг. 10А и фиг. 10В, соответственно, представляют собой масс-спектры rhGH с мутацией Lys-азидо в сайте 140 и rhGH с мутацией NBOK в сайте 140 из примера 11.

Фиг. 11А и фиг. 11В представляют собой, соответственно, ДСН-ПААГ-электрофореграммы процессов связывания rhGH с мутацией Lys-азидо в сайте 140 и rhGH с мутацией NBOK в сайте 140 из примера 11 с 30 кДа ПЭГ, где различные дорожки на фиг. 11А, соответственно, представлены следующими: Дорожка 1: маркер молекулярной массы; дорожка 2: рекомбинантный гормон роста человека дикого типа; дорожка 3: rhGH-Lys-азидо-140; дорожка 4: продукт реакции сопряжения в течение 72 часов, когда соотношение rhGH-

Lys-азидо-140: БЦН-ПЭГ с MW 30 000 (30К) составляет 1:15 (молярное соотношение, то же самое ниже); и дорожка 5: продукт реакции сопряжения в течение 72 часов, когда соотношение rhGH-Lys-азидо-140: 30К БЦН-ПЭГ составляет 1:25; различные дорожки на фиг. 11В, соответственно, представлены следующими: дорожка 1: маркер молекулярной массы; Дорожка 2: rhGH-NBOK-140; дорожка 3: продукт реакции сопряжения в течение 6 часов, когда соотношение rhGH-NBOK-140: 30К БЦН-ПЭГ составляет 1:15; дорожка 4: продукт реакции сопряжения в течение 9 часов, когда соотношение rhGH-NBOK-140: 30К БЦН-ПЭГ составляет 1:15; дорожка 5: продукт реакции сопряжения в течение 12 часов, когда соотношение rhGH-NBOK-140: 30К БЦН-ПЭГ составляет 1:15; дорожка 6: продукт реакции сопряжения в течение 24 часов, когда соотношение rhGH-NBOK-140: 30К БЦН-ПЭГ составляет 1:15; и дорожка 7: продукт реакции сопряжения в течение 48 часов, когда соотношение rhGH-NBOK-140: 30К БЦН-ПЭГ составляет 1:15.

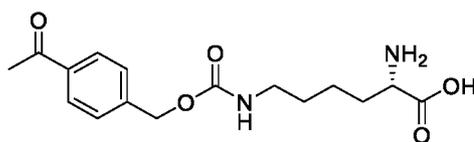
ВАРИАНТ РЕАЛИЗАЦИИ:

Технические решения согласно настоящему изобретению дополнительно более подробно описаны ниже со ссылками на конкретные примеры.

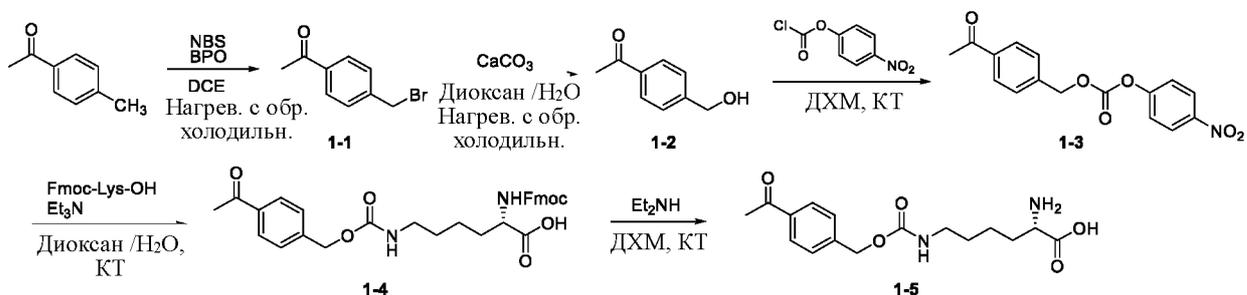
Если не указано иное, все реагенты или исходные материалы, применяемые в примерах реализации настоящего изобретения, являются коммерчески доступными.

Пример 1. Получение неприродной аминокислоты NBOK

NBOK имела следующую структурную формулу:



Процесс реакции показан на следующем чертеже:



Процесс получения включал следующие этапы.

а) В реакционную колбу добавляли *n*-метилацетофенон (4,0 мл, 30,0 ммоль), растворитель DCE (50,0 мл), NBS (6,41 г, 36,0 ммоль) и BPO (0,05 г, 0,3 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником при 80°C в течение 24 часов, затем контейнер

охлаждали в ледяной воде для осаждения твердого вещества, и твердое вещество удаляли фильтрацией. Раствор 3-кратно промывали насыщенным Na_2CO_3 , а затем 3-кратно экстрагировали ДХМ. Органические фазы объединяли, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта **1-1** (5,46 г, выход 85%), который использовали непосредственно на следующем этапе без очистки.

б) Продукт **1-1** (2,73 г, 12,80 ммоль), растворитель диоксан (40 мл) и воду (40 мл) добавляли в реакционную колбу, а затем добавляли карбонат кальция (7,68 г, 76,8 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником при 105°C в течение 24 часов, охлаждали до комнатной температуры, фильтровали для удаления твердого вещества и затем экстрагировали ДХМ 3-кратно. Органические фазы объединяли, концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ПЭ:ЭА = 3:1) с получением продукта **1-2** (1,80 г, выход 94%).

в) *l*-нитрофенилхлорформиат (2,90 г, 14,4 ммоль) и растворитель ДХМ (10,0 мл) добавляли в двухгорлую реакционную колбу, охлаждали до 0°C , добавляли продукт **1-2** (1,80 г, 12,0 ммоль) и пиридин (1,2 мл, 14,4 ммоль), перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов, а затем к реакционному раствору добавляли насыщенный раствор карбоната натрия (10 мл) и экстрагировали ДХМ (50 мл) 3-кратно. Органические фазы объединяли, дважды промывали водой, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали, концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ПЭ:ЭА = 5:1) с получением продукта **1-3** (3,14 г, выход 83%).

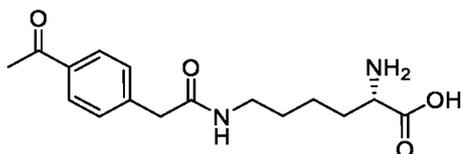
г) В реакционную колбу добавляли продукт **1-3** (1,26 г, 4,0 ммоль) и гидрохлорид Fmoc-Lys-OH (1,40 г, 3,33 ммоль), растворитель диоксан (15 мл) и воду (5 мл), а затем добавляли триэтиламин (1,2 мл, 8,3 ммоль). Реакцию смеси проводили при комнатной температуре в течение 24 часов, а затем добавляли соответствующее количество 1 М раствора HCl , экстрагировали ДХМ и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта **1-4**, который непосредственно использовали на следующем этапе.

д) Продукт **1-4** (1,10 г, 0,19 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл) в реакционной колбе и добавляли диэтиламин (5,0 мл) для проведения реакции при комнатной температуре в течение 6 часов для осаждения продукта. Продукт фильтровали, а затем 3-кратно перетирали с ДХМ с получением целевого продукта NBOK (**1-5**, 817 мг, выход после двух этапов 63%).

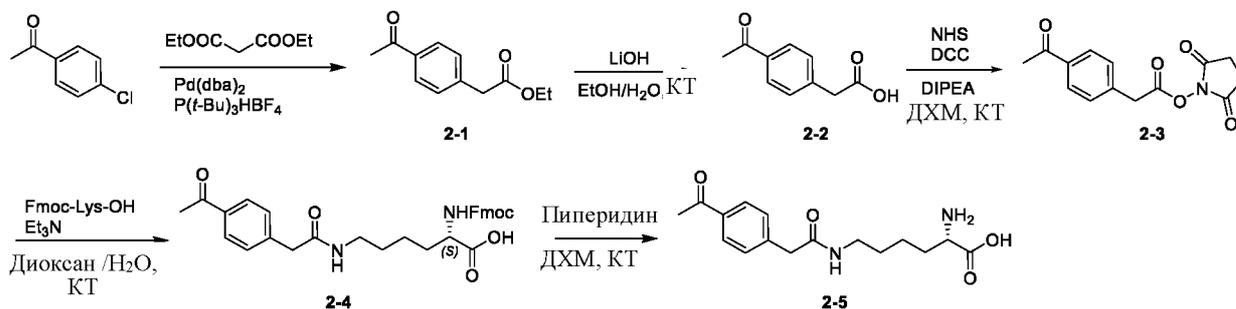
^1H -ЯМР (400 МГц, тяжелая вода) δ 8,04 (д, $J = 8,4$ Гц, 2H), 7,55 (д, $J = 8,0$ Гц, 2H), 5,21 (с, 2H), 3,74 (т, $J = 6,0$ Гц, 1H), 3,17 (т, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,70 (с, 3H), 1,95 – 1,83 (м, 2H), 1,62 – 1,52 (м, 2H), 1,47 – 1,35 (м, 2H).

Пример 2. Получение не природной аминокислоты ПРАК

ПРАК имела следующую структурную формулу:



Процесс реакции показан на следующем чертеже:



Процесс получения включал следующие этапы.

а) В реакционную колбу добавляли *n*-хлорацетофенон (1,00 г, 6,47 ммоль), диэтилмалонат (6,84 г, 47,70 ммоль), KHCO_3 (0,97 г, 9,70 ммоль) и K_2CO_3 (1,34 г, 9,70 ммоль) в атмосфере азота, а затем добавляли $\text{Pd}(\text{dba})_2$ (0,019 г, 0,030 ммоль) и три-трет-бутилфосфония тетрафторборат ($\text{P}(t\text{-Bu})_3\text{HBF}_4$) (0,021 г, 0,071 ммоль). Азот заменяли для защиты после добавления, и нагревали смесь до 160°C для проведения реакции в течение 40 часов. После определения завершения реакции с помощью ТСХ к реакционному раствору добавляли воду (30 мл) и проводили экстракцию этилацетатом 3-кратно. Органические фазы объединяли, дважды промывали водой, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении при 0°C – 5°C с получением бесцветной прозрачной жидкости, и жидкость очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ПЭ:ЭА= 10:1) с получением продукта **2-1** (0,80 г, выход 60%).

б) LiOH (0,30 г, 11,64 ммоль) и воду (5,0 мл), этанол (10 мл) и продукт **2-1** (0,80 г, 3,88 ммоль) добавляли в реакционную колбу и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. После определения завершения реакции с помощью ТСХ к реакционному раствору добавляли 2 М раствор HCl для доведения значения pH до 1–2, а затем экстрагировали ЭА 3-кратно. Органические фазы объединяли, дважды промывали водой, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением продукта **2-2** (0,5 г, выход 72%).

с) Продукт **2-2** (0,20 г, 1,12 ммоль) добавляли в реакционную колбу и последовательно добавляли N-гидроксисукцинимид (NHS, 0,19 г, 1,68 ммоль), DIPEA (0,07 г, 0,56 ммоль) и ДХМ (2,0 мл). Смесь охлаждали до 0°C - 5°C, добавляли раствор ДХК (0,23 г, 1,12 ммоль) и ДХМ (2,0 мл) для проведения термоизолированной реакции в течение 2 часов и нагревали до комнатной температуры для перемешивания в течение ночи. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ реакционный раствор фильтровали и промывали ДХМ, концентрировали маточный раствор при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ПЭ:ЭА = 5:1) с получением продукта **2-3** (0,19 г, выход 62%).

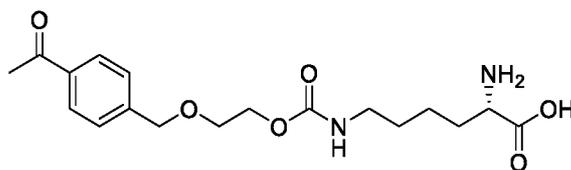
д) Продукт **2-3** (0,10 г, 0,36 ммоль) добавляли в реакционную колбу и последовательно добавляли триэтиламин (0,04 г, 0,36 ммоль), гидрохлорид Fmoc-Lys-OH (0,13 г, 0,36 ммоль), диоксан (2,0 мл) и воду (2,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре для проведения реакции в течение 18 часов. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении, экстрагировали ЭА 3-кратно, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ДХМ: MeOH = 15:1), с получением продукта **2-4** (0,03 г, выход 61%).

е) Продукт **2-4** (0,08 г, 0,15 ммоль), ДХМ (1,0 мл) и пиперидин (0,04 г, 0,47 ммоль) добавляли в реакционную колбу и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении, перетирали с петролейным эфиром (5 мл) в течение 1 часа и фильтровали. Остаток на фильтре повторно перетирали с петролейным эфиром (5 мл) в течение 1 часа и фильтровали, а затем остаток на фильтре повторно перетирали с этанолом 4-кратно для удаления остаточного пиперидина, с получением в итоге белого твердого вещества **2-5** (0,02 г, выход 43%).

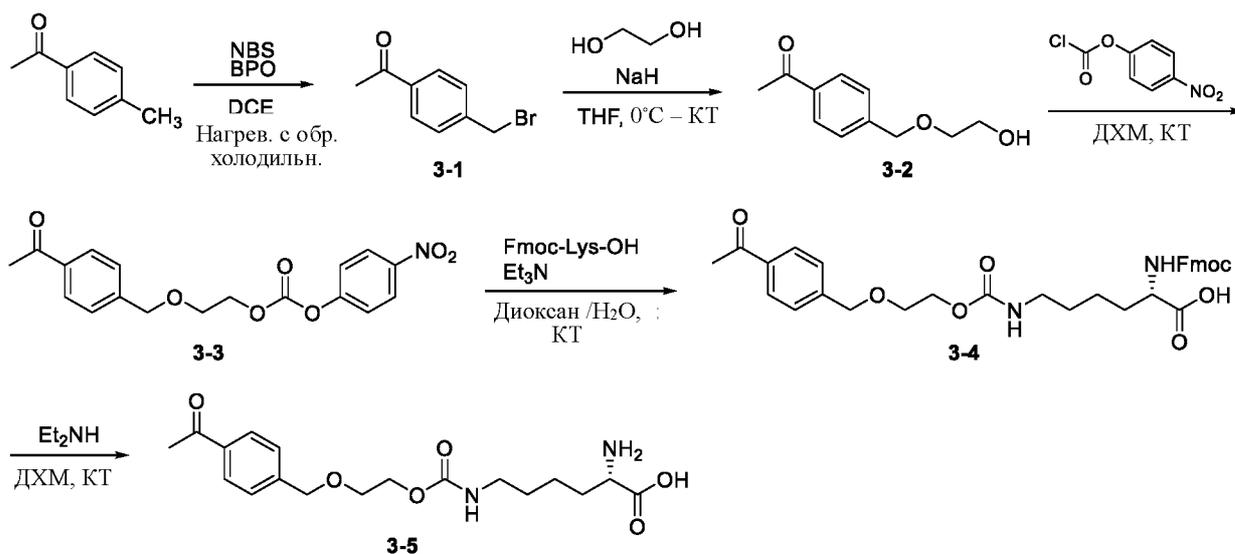
¹H-ЯМР (400 МГц, тяжелая вода) δ 7,85 (д, J = 8,2 Гц, 2H), 7,33 (д, J = 8,2 Гц, 2H), 3,94 (т, J = 6,3 Гц, 1H), 3,56 (с, 2H), 3,12 (т, J = 6,8 Гц, 2H), 2,54 (с, 3H), 1,80 – 1,70 (м, 2H), 1,54 – 1,45 (м, 2H), 1,40 - 1,224 (м, 2H).

Пример 3. Получение неприродной аминокислоты NBPK

NBPK имела следующую структурную формулу:



Процесс реакции показан на следующем чертеже:



Процесс получения включал следующие этапы.

а) В реакционную колбу добавляли *m*-метилацетофенон (4,0 мл, 30,0 ммоль), DCE (50,0 мл), NBS (6,41 г, 36,0 ммоль) и BPO (0,05 г, 0,3 ммоль), и полученную смесь кипятили с обратным холодильником при 80°C в течение 24 часов. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ контейнер охлаждали в ледяной воде для осаждения твердого вещества, и удаляли твердое вещество путем фильтрации. Раствор промывали насыщенным раствором Na₂CO₃ 3-кратно и проводили экстракцию ДХМ 3-кратно. Органические фазы объединяли, добавляли безводный сульфат натрия для высушивания, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта **3-1** (5,46 г, выход 85%), который непосредственно использовали на следующем этапе без очистки.

б) В реакционную колбу добавляли NaH (0,58 г, 14,64 ммоль, 60%), сухой растворитель THF (20 мл), и медленно добавляли этиленгликоль (6,7 мл, 122,0 ммоль) при охлаждении на ледяной бане. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем добавляли продукт **3-1** (2,60 г, 12,2 ммоль), нагревали и кипятили с обратным холодильником при 70°C в течение 48 часов до завершения реакции. Насыщенный NH₄Cl медленно по каплям добавляли при охлаждении на ледяной бане для гашения NaH, а затем раствор промывали водой и экстрагировали EtOAc 3-кратно. Органические фазы объединяли, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали, концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ПЭ:ЭА = 2:1) с получением продукта **3-2** (1,39 г, выход 59%).

в) Продукт **3-2** (1,39 г, 7,2 ммоль) и растворитель DCM (10 мл) добавляли в реакционную колбу, и *p*-нитрофенилхлорформиат (1,74 г, 8,64 ммоль) и пиридин (0,7 мл, 8,64 ммоль) добавляли при охлаждении на ледяной бане. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ к реакционному раствору добавляли воду для промывания и экстрагировали EtOAc 3-кратно.

Органические фазы объединяли, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали, концентрировали при пониженном давлении, а затем очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ПЭ:ЭА = 3:1) с получением продукта **3-3** (2,27 г, выход 88%).

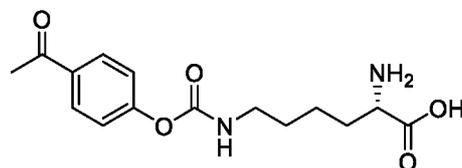
5 d) Продукт **3-3** (2,27 г, 6,32 ммоль), растворитель диоксан (16 мл), воду (4 мл) и гидрохлорид Fmoc-Lys-OH (2,13 г, 5,27 ммоль) добавляли в реакционную колбу, а затем добавляли триэтиламин (1,85 мл, 13,2 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов до завершения реакции. В раствор добавляли соответствующее количество 1 М HCl для доведения значения pH приблизительно до 2, и
10 проводили экстракцию этилацетатом. Органические фазы объединяли, высушивали с применением безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта **3-4**, который непосредственно использовали на следующем этапе.

15 e) Продукт **3-4** с предыдущего этапа растворяли в ДХМ (10 мл) в реакционной колбе и добавляли диэтиламин (5 мл) для проведения реакции при комнатной температуре в течение 6 часов. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ДХМ: MeOH: H₂O = 40:10:1) с получением продукта в виде твердого вещества белого цвета (**3-5**, 0,95 г, выход после двух этапов 49%).

20 ¹H-ЯМР (400 МГц, тяжелая вода) δ 8,04 (д, J = 8,0 Гц, 2H), 7,56 (д, J = 8,0 Гц, 2H), 4,72 (с, 2H), 4,25 (с, 2H), 3,81 (с, 2H), 3,74 (т, J = 6,0 Гц, 1H), 3,16 – 3,08 (м, 2H), 2,70 (с, 3H), 1,97 – 1,79 (м, 2H), 1,60 – 1,48 (м, 2H), 1,48 – 1,35 (м, 2H).

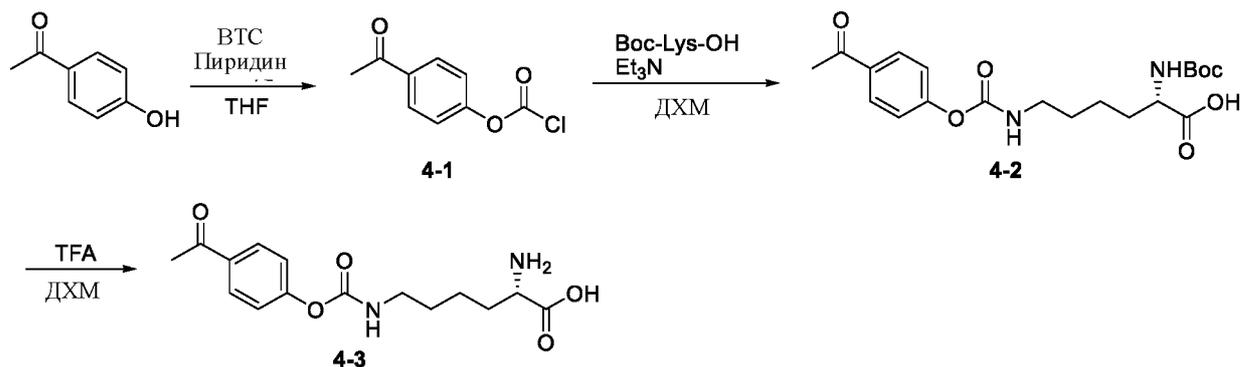
Пример 4. Получение неприродной аминокислоты НРОК

НРОК имела следующую структурную формулу:



25

Процесс реакции показан на следующем чертеже:



Процесс получения включал следующие этапы.

а) Трифосген (ВТС, 2,18 г, 7,35 ммоль) и растворитель ТГФ (10,0 мл) добавляли в реакционную колбу; *p*-гидроксиацетофенон (2,0 г, 14,7 ммоль) и пиридин (1,5 мл, 17,64 ммоль) добавляли при охлаждении на ледяной бане. Реакцию смеси проводили при комнатной температуре в течение 24 часов. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ к реакционному раствору добавляли соответствующее количество воды и экстрагировали EtOAc 3-кратно. Органические фазы объединяли, высушивали с использованием водного раствора сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта **4-1** (1,20 г), который непосредственно использовали на следующем этапе.

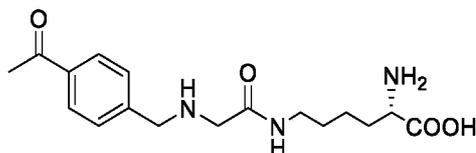
б) В реакционную колбу добавляли Вос-лизин (1,1 г, 5,0 ммоль), растворитель ДХМ (10,0 мл), продукт **4-1** (1,20 г) и триэтиламин (2 мл, 15 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ к реакционному раствору добавляли соответствующее количество 1 М HCl для доведения pH до слабокислотного уровня и экстрагировали ДХМ 3-кратно. Органические фазы объединяли, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали, концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ДХМ:MeOH = 5:1) с получением продукта **4-2** (1,70 г, выход 84%).

в) Продукт **4-2** (1,70 г, 4,2 ммоль), растворитель ДХМ (5 мл) и трифторуксусную кислоту (5 мл) добавляли в реакционную колбу. Реакцию смеси проводили при комнатной температуре в течение 1 часа. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ, реакционный раствор непосредственно концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ДХМ: MeOH: H₂O = 40:10:1), с получением продукта **4-3** (1,19 г, выход 92%).

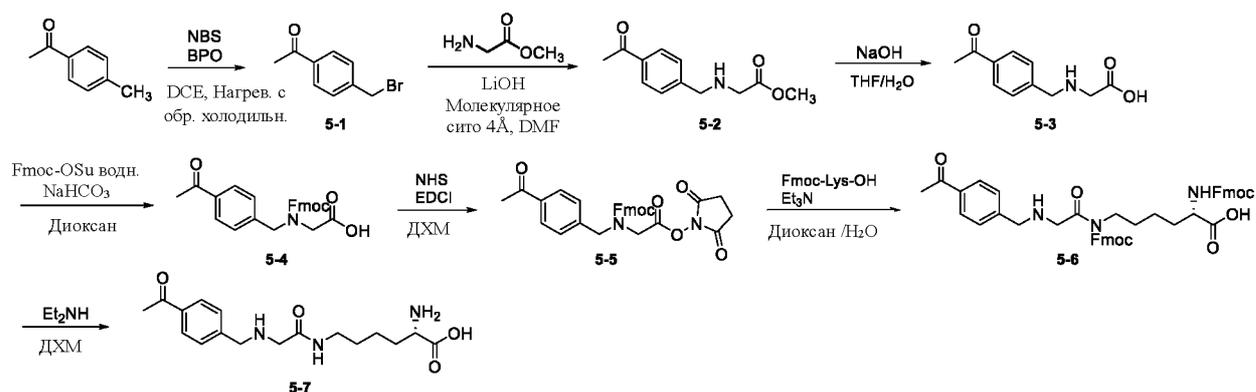
¹H-ЯМР (400 МГц, тяжелая вода) δ 8,09 (д, *J* = 8,6 Гц, 2H), 7,31 (д, *J* = 8,6 Гц, 2H), 3,78 (т, *J* = 6,0 Гц, 1H), 3,27 (т, *J* = 6,8 Гц, 2H), 2,70 (с, 3H), 1,98 – 1,87 (м, 2H), 1,72 – 1,60 (м, 2H), 1,55 – 1,43 (м, 2H).

Пример 5. Получение неприродной аминокислоты NBGK

NBGK имела следующую структурную формулу:



Процесс реакции показан на следующем чертеже:



5

Процесс получения включал следующие этапы.

а) В реакционную колбу добавляли *m*-метилацетофенон (8,0 мл, 60,0 ммоль), растворитель DCE (80,0 мл), NBS (12,82 г, 72,0 ммоль) и BPO (145 мг, 0,6 ммоль), и полученную смесь кипятили с обратным холодильником при 90°C в течение 24 часов. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ контейнер охлаждали в ледяной воде для осаждения твердого вещества, и удаляли твердое вещество путем фильтрации. Раствор промывали насыщенным раствором Na₂CO₃ 3-кратно и проводили экстракцию ДХМ 3-кратно. Органические фазы объединяли, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта **5-1** (11,12 г, выход 87%), который применяли непосредственно на следующем этапе без очистки.

б) Молекулярное сито 4Å (14 г) и LiOH (1,45 г, 34,54 ммоль) растворяли в ДМФА (70 мл) в реакционной колбе и перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут, затем добавляли гидрохлорид глицинметилового эфира (2,0 г, 15,7 ммоль) и перемешивали в течение 45 минут, а затем добавляли продукт **5-1** (4,0 г, 18,8 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. После детекции завершения реакции с помощью ТСХ твердое вещество удаляли с помощью фильтрации, остаток на фильтре промывали ЭА, фильтрат дважды промывали водой, высушивали с применением безводного сульфата натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта **5-2**, который непосредственно использовали на следующем этапе.

в) Продукт **5-2** с предыдущего этапа растворяли в диоксане (20 мл) в реакционной колбе и медленно по каплям добавляли 1 М NaOH для проведения реакции в течение 2 часов,

а затем отслеживали завершение реакции гидролиза с помощью ТСХ с получением продукта **5-3**. К продукту **5-3** добавляли 20 мл насыщенного NaHCO_3 , медленно добавляли Fmoc-OSu, растворенный в диоксане (10 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После отслеживания завершения реакции с помощью ТСХ реакционный раствор доводили до слабокислотных значений с использованием 1 М HCl , экстрагировали ЭА, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ДХМ:MeOH = 10:1) с получением продукта **5-4** (3,60 г, выход 89%).

d) В реакционную колбу добавляли продукт **5-3** (3,60 г, 8,0 ммоль), NBS (1,10 г, 9,6 ммоль), EDCI (1,85 г, 9,6 ммоль) и растворитель ДХМ (50 мл). Реакцию смеси проводили при комнатной температуре в течение 18 часов. После отслеживания завершения реакции с помощью ТСХ реакционный раствор промывали водой 3-кратно, высушивали с использованием безводного сульфата натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением продукта **5-5** (3,20 г, выход 75%).

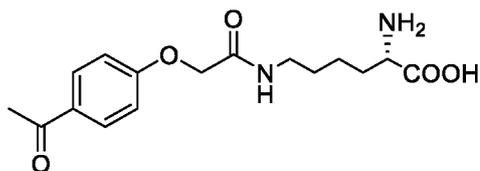
e) В реакционную колбу добавляли продукт **5-5** (3,20 г, 6,0 ммоль), растворитель диоксан (40 мл), воду (10 мл) и гидрохлорид Fmoc-Lys-OH (3,0 г, 7,2 ммоль), а затем добавляли триэтиламин (2,0 мл, 15,0 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов до завершения реакции. В раствор добавляли соответствующее количество 1 М HCl для доведения значения pH приблизительно до 2, и проводили экстракцию этилацетатом. Органические фазы объединяли, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали, концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: DCM: MeOH: AcOH = 20:1:0,5) с получением продукта **5-5** (3,50 г, выход 75%).

f) Продукт **5-5** растворяли в ДХМ (20 мл) в реакционной колбе и добавляли диэтиламин (20 мл) для проведения реакции при комнатной температуре в течение 6 часов. После отслеживания завершения реакции с помощью ТСХ реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ДХМ: MeOH: H_2O = 30:10:1) с получением конечного продукта **5-7** в виде белого порошка (0,55 г, выход 37%).

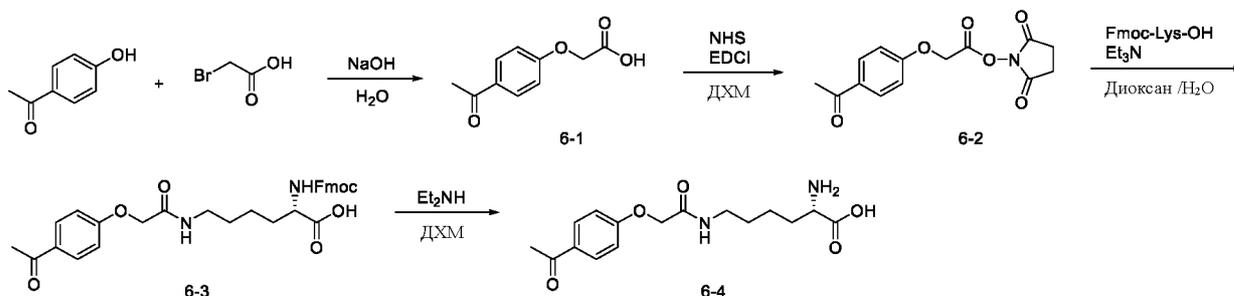
^1H -ЯМР (400 МГц, тяжелая вода) δ 7,98 (д, $J = 8,2$ Гц, 2H), 7,50 (д, $J = 8,2$ Гц, 2H), 3,84 (с, 2H), 3,71 (с, 1H), 3,31 (с, 2H), 3,17 (т, $J = 6,9$ Гц, 2H), 2,67 (с, 3H), 1,97 – 1,73 (м, 2H), 1,58 – 1,45 (м, 2H), 1,44 – 1,27 (м, 2H).

Пример 6 Получение неприродной аминокислоты NPOK-2

NPOK-2 имела следующую структурную формулу:



Процесс реакции показан на следующем чертеже:



Процесс получения включал следующие этапы.

5 а) *p*-Ацетилфенол (2,05 г, 15,0 ммоль) и бромуксусную кислоту (2,50 г, 18,0 ммоль) добавляли в реакционную колбу, а затем добавляли водный раствор (6 мл) NaOH (1,20 г, 30 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником при 100°C в течение 24 часов до завершения реакции. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры, доводили до кислотного уровня путем добавления 1 М соляной кислоты для осаждения твердого
10 вещества и фильтровали с получением неочищенного продукта белого цвета **6-1** (3,32 г, выход 113%), который непосредственно использовали на следующем этапе без очистки.

б) Неочищенный продукт **6-1** (3,32 г, 17,0 ммоль) с предыдущего этапа растворяли в ДХМ (50 мл) в реакционной колбе и добавляли NHS (2,35 г, 20,4 ммоль) и EDCI (3,90 г, 20,4 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов до завершения
15 реакции. Реакционный раствор экстрагировали ДХМ. Органические фазы объединяли, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали, концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: DCM: MeOH: AcOH = 20:1:0,5), с получением продукта **6-2** (1,67 г, выход 38%).

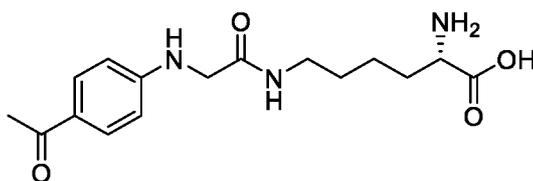
в) В реакционную колбу добавляли продукт **6-2** (1,67 г, 5,7 ммоль), растворитель диоксан (20 мл) и воду (50 мл) и гидрохлорид Fmoc-Lys-OH (1,9 г, 4,8 ммоль), а затем добавляли триэтиламин (1,7 мл, 12,0 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной
20 температуре в течение 18 часов до завершения реакции. В раствор добавляли соответствующее количество 1 М HCl для доведения значения pH приблизительно до 2, и проводили экстракцию этилацетатом. Органические фазы объединяли, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при
25 пониженном давлении. Полученный неочищенный продукт **6-3** непосредственно растворяли в ДХМ (10 мл) и затем добавляли диэтиламин (5 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов до завершения реакции. Реакционный раствор

концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: ДХМ: MeOH: H₂O = 40:10:1) с получением конечного продукта **6-4** (709 мг, выход после двух этапов 39%).

¹H-ЯМР (400 МГц, тяжелая вода) δ 7,91 (д, *J* = 8,8 Гц, 2H), 6,98 (д, *J* = 8,8 Гц, 2H), 4,60 (с, 2H), 3,59 (т, *J* = 6,4 Гц, 1H), 3,19 (т, *J* = 6,8 Гц, 2H), 2,52 (с, 3H), 1,87 – 1,65 (м, 2H), 1,56 – 1,40 (м, 2H), 1,35 – 1,15 (м, 2H).

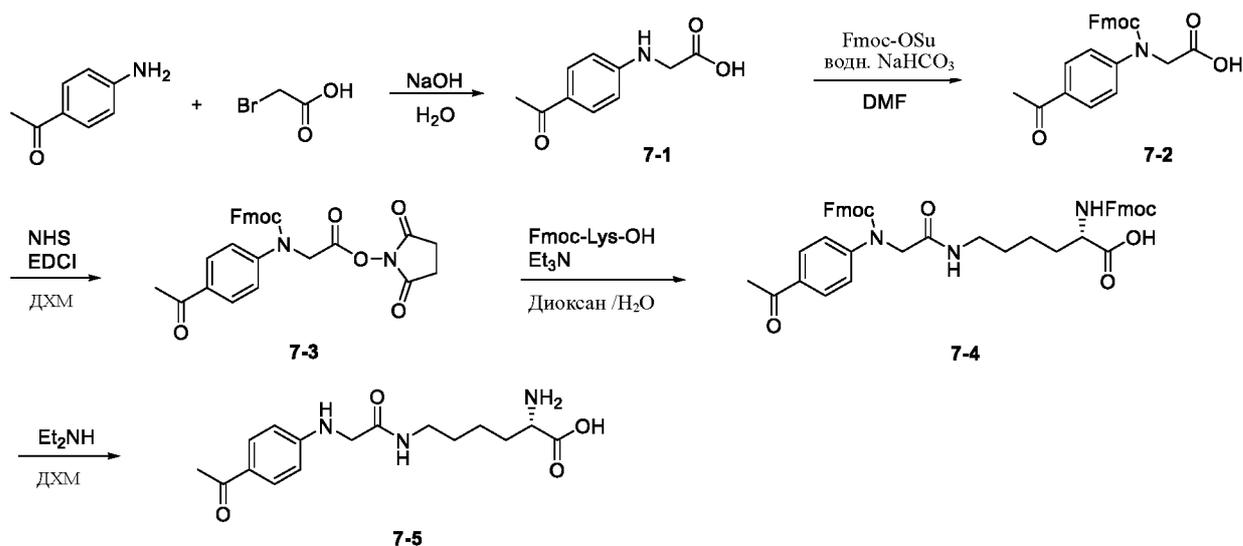
Пример 7 Получение неприродной аминокислоты NBGK-2

NBGK-2 имела следующую структурную формулу::



10

Процесс реакции показан на следующем чертеже:



Процесс получения включал следующие этапы.

а) Бромуксусную кислоту (2,10 г, 15,0 ммоль) и водный раствор (10 мл) NaOH (0,80 г, 20 ммоль) добавляли в реакционную колбу и перемешивали в течение 10 минут, а затем добавляли *n*-ацетиланилин (1,40 г, 10,0 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником при 100°C в течение 18 часов до завершения реакции. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и промывали водой с получением неочищенного продукта белого цвета **7-1** (1,30 г, выход 67%), который применяли непосредственно на следующем этапе без очистки.

20

б) Продукт **7-1** (1,30 г, 6,7 ммоль) и водный раствор (20 мл) NaHCO₃ (1,70 г, 20,1 ммоль) добавляли в реакционную колбу, а затем добавляли Fmoc-OSu (2,80 г, 8,1 ммоль) и DMF (20 мл). Смесь перемешивали при 60°C в течение 18 часов до завершения реакции. Реакционный

раствор охлаждали до комнатной температуры и проводили экстракцию ЭА. Водную фазу сохраняли и доводили значение рН приблизительно до 2 с использованием 1 М соляной кислоты. Затем в реакционном растворе проводили экстракцию ЭА с получением органических фаз, которые высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением продукта 7-2, который непосредственно использовали на следующем этапе без очистки.

с) Продукт 7-2 (приблизительно 6,7 ммоль) с предыдущего этапа, NHS (0,90 г, 8,0 ммоль) и EDCI (1,50 г, 8,0 ммоль) растворяли в ДМФА (50 мл) в реакционной колбе. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов до завершения реакции. В реакционный раствор добавляли воду и проводили экстракцию ДХМ с получением органических фаз, которые высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением продукта 7-3, который непосредственно использовали на следующем этапе без очистки.

d) Продукт 7-3 (около 6,7 ммоль) с предыдущего этапа, гидрохлорид Fmoc-Lys-OH (2,30 г, 5,6 ммоль) и триэтиламин (2,0 мл, 14,0 ммоль) добавляли в реакционную колбу. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до завершения реакции. Затем значение рН реакционного раствора доводили приблизительно до 2 с использованием 1 М соляной кислоты, проводили экстракцию ЭА, высушивали с использованием безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением продукта 7-4, который непосредственно использовали на следующем этапе без очистки.

е) Продукт 7-4 с предыдущего этапа, растворитель DCM (20 мл) и диэтиламин (10 мл) добавляли в реакционную колбу. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов до завершения реакции. Реакционный раствор сначала концентрировали при пониженном давлении, добавляли ацетонитрил (50 мл) для повторного растворения, а затем концентрировали при пониженном давлении; указанную операцию повторяли 3-кратно для удаления избытка диэтиламина. К реакционному раствору добавляли ДХМ для двукратного перетирания с получением конечного продукта 7-5 (1,65 г, общий выход 51%).

^1H -ЯМР (400 МГц, тяжелая вода) δ 7,71 (д, $J = 8,8$ Гц, 2H), 6,51 (д, $J = 8,8$ Гц, 2H), 3,80 (с, 2H), 3,53 (т, $J = 6,8$ Гц, 1H), 3,09 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,39 (с, 3H), 1,73 – 1,60 (м, 2H), 1,42 – 1,33 (м, 2H), 1,25 – 1,14 (м, 2H).

Пример 8

Рекомбинантные гормоны роста человека получали в прокариотической экспрессионной системе с NPOK, NPAK, NBOK, NBPK, NBGK, NPOK-2 и NBGK-2,

полученными в примерах 1-7, и получали сайт-специфические конъюгаты с ПЭГ.

(1) Получение хелперной плазмиды

Хелперную плазмиду pSupAR-MbPylRS приобретали у организации по сохранению плазмид Addgene (номер по каталогу: #91705). Плазмида может экспрессировать тРНК, специфически распознающую неприродную аминокислоту, полученную из пирролизина, в *Escherichia coli*, и тРНК-синтетазу. Хелперную плазмиду экстрагировали после культивирования во встряхиваемой колбе в среде LB с добавлением 37,5 мг/л хлорамфеникола.

(2) Конструирование экспрессионной плазмиды для рекомбинантного гормона роста человека, содержащей терминирующие кодоны внутри рамки считывания

Последовательность мРНК кодирующего гена гормона роста *Homo sapiens* (с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1) получали из базы данных Национального центра биотехнологической информации США; к С-концу транслируемого белка добавляли метку очистки, состоящую из шести гистидинов. При этом кодоны аминокислоты в сайте 107 в SEQ ID NO: 1 заменяли на янтарные кодоны (TAG), а затем синтезировали последовательность ДНК целиком путем синтеза полного гена с получением последовательности гена (SEQ ID NO: 2) рекомбинантного гормона роста человека.

Последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 1) гормона роста *Homo sapiens* была следующей:

```
FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIP  
TPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEG  
IQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIV  
QCRSVEGSCGF
```

Последовательность гена (SEQ ID NO: 2) рекомбинантного гормона роста человека была следующей:

```
ATGTTTCCTACTATACCACTATCTCGTCTATTCGATAACGCTATGCTTCGGGCCCAT  
CGTCTTCATCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCCTATATCCCAA  
AGGAACAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGTTTCTCAGAGTC  
TATCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCT  
CCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGGCTGGAGCCCGTGCAGTTCCTCAGGAGT  
GTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTCTTAGAGCAACGTCTATGACCTCCTAA  
AGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCC  
CGGACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTTCGACACAAACTCACACAAC  
GATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGAC  
AAGGTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGC  
TTCCTCGAGCACCACCACCACCACCTAA
```

Генную последовательность (SEQ ID NO: 2) рекомбинантного гормона роста человека клонировали между двумя сайтами разрезания ферментами *Nde I* и *Xho I* pET21a (Novagen, номер по каталогу: #69740-3) путем одноэтапного субклонирования с получением

экспрессионной плазмиды pET21-rhGH107, последовательность которой была подтверждена как соответствующая ожидаемой последовательности путем секвенирования. pET21-rhGH107 можно применять для экспрессии рекомбинантного гормона роста человека с заменой кодонов аминокислоты в сайте 107 на янтарные кодоны, и С-концом белка, содержащим метку очистки, состоящую из шести гистидинов. Профиль экспрессионной плазмиды pET21-rhGH107 рекомбинантного гормона роста человека представлен на фиг. 1.

(3) Получение целевого экспрессионного штамма

Хелперной плазмидой pSupAR-MbPylRS и экспрессионной плазмидой pET21-rhGH107, описанной выше, совместно трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* OrigamiB (DE3) (Novagen, номер по каталогу: # 70911-3), и получали штамм с двойной устойчивостью путем скрининга на среде LB, содержащей 100 мг/л ампициллина и 37,5 мг/л хлорамфеникола, то есть штамм для экспрессии рекомбинантного гормона роста человека.

(4) Экспрессия рекомбинантного белка с инсертированными неприродными аминокислотами

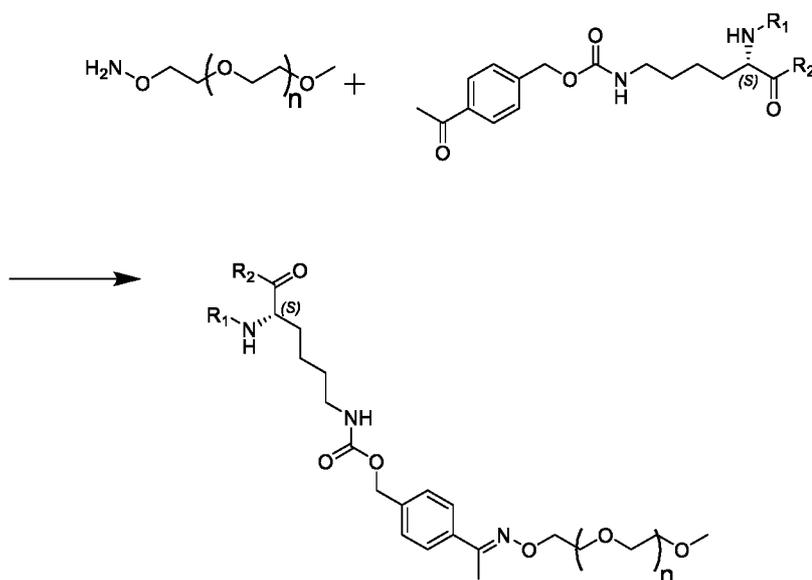
Подвергнутый скринингу штамм для экспрессии рекомбинантного гормона роста человека инокулировали в разделенную на восемь частей среду 2×YT (16 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л триптона и 5 г/л NaCl, содержащей 100 мг/л ампициллина и 37,5 мг/л хлорамфеникола) и культивировали при 37°C до тех пор, пока OD600 бактериальной жидкости не составляла $2,0 \pm 0,2$. В восемь аликвот, соответственно, добавляли IPTG (до конечной концентрации 1 мМ) и арабинозу (до конечной концентрации 0,2%), в первую аликвоту добавляли NВОК (до конечной концентрации 1 мМ), во вторую аликвоту добавляли NРАК (до конечной концентрации 1 мМ), в третью аликвоту добавляли NВРК (до конечной концентрации 1 мМ), в четвертую аликвоту добавляли NВГК (до конечной концентрации 1 мМ), в пятую аликвоту добавляли NРОК (до конечной концентрации 1 мМ), в шестую аликвоту добавляли NРОК-2 (до конечной концентрации 1 мМ), в седьмую аликвоту добавляли NВГК-2 (до конечной концентрации 1 мМ); в восьмую аликвоту не добавляли неприродную аминокислоту для использования аликвоты в качестве отрицательного контроля. После культивирования восьми аликвот при 37°C для индуцирования экспрессии в течение 5-6 часов, отбирали по 1 мл каждого культурального раствора, центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 1 минуты и ресуспендировали в ФСБ до OD600 10, и все аликвоты забирали для ДСН-ПААГ-электрофореза. ДСН-ПААГ-электрофореграммы для всех штаммов приведены на фиг. 2. Результаты на фиг. 2 показывают, что экспрессионные штаммы с добавлением, соответственно, семи неприродных аминокислот могут экспрессировать целевые белки.

(5) Очищение рекомбинантного белка с инсертированной неприродной аминокислотой

Каждую аликвоту после индуцированной экспрессии согласно описанию выше центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 5 минут, извлекали осадок; добавляли буфер NTA (20 мМ Tris-HCl с pH 7,9, 0,5 М NaCl и 10% глицерина) в количестве 1/20 от объема культивированных клеток, и PMSF до конечной концентрации 1 мМ; клетки гомогенизировали и разрушали ультразвуковой волной. Раствор центрифугировали при 10

000 об/мин в течение 20 минут, извлекали супернатант и адсорбировали целевой белок с His-меткой на хроматографической колонке Ni-NTA, а затем элюировали, используя в качестве элюента буфер NTA (20 mM Tris-HCl с pH 7,9, 0,5 M NaCl, 10% глицерина и 250 mM имидазола) с получением образца целевого белка (т.е. рекомбинантного белка с инсертированной неприродной аминокислотой) с чистотой около 90%. Каждый образец помещали в нитроцеллюлозный диализный мешок с отсечением по молекулярной массе 10 000, и проводили диализ в буфере ФСБ при pH 7,0 (200 мл диализата на 1 мл раствора белка) в течение ночи; диализат заменяли один раз. Раствор белка после диализа собирали, и концентрацию белка определяли с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза.

(6) Реакция сопряжения между рекомбинантным белком с инсертированной неприродной аминокислотой, и ПЭГ



Как показано выше в описании пути синтеза (где направление от R₁ к R₂ представляет собой направление от N-конца к С-концу аминокислотной последовательности).

Если взять в качестве примера реакцию оксимирования 30 кДа аминокси-ПЭГ, сопряженного с рекомбинантным белком с инсертированной неприродной аминокислотой, реакцию сопряжения проводили следующим образом: перед реакцией сопряжения концентрацию полученного согласно описанию выше целевого белка доводили до 0,5 мг/мл буфером ФСБ с pH 7,0, добавляли твердый 30 кДа аминокси-ПЭГ (от Beijing Jenkem Technology Co., Ltd.) в соотношении 1:15 (молярное отношение рекомбинантного белка к аминокси-ПЭГ) и тщательно встряхивали для растворения с получением прозрачного бесцветного раствора. Затем реакционный раствор закрывали и встряхивали в шейкере с постоянной температурой (25°C, 100 об/мин). Статус сопряжения анализировали с помощью ДСН-ПААГ через 48 часов, как показано на фиг. 3. Результаты на фиг. 3 показывают, что произошло сопряжение всех шести целевых белков с 30 кДа ПЭГ, и дополнительно свидетельствуют, что семь неприродных аминокислот, указанных выше, были инсертированы в целевые белки. Продукты сопряжения рекомбинантного белка с инсертированной неприродной аминокислотой с ПЭГ сокращенно обозначали как «ПЭГ-

rhGH».

(7) Очистка ПЭГ-rhGH

ПЭГ-rhGH после сопряжения отделяли и очищали на колонке Butyl HP для гидрофобной хроматографии (загрузочный буфер: 50 mM NaH₂PO₄·2H₂O и 0,8 M (NH₄)₂SO₄ с pH 8,5; буфер для элюирования: 20 mM Tris-HCl с pH 8,5 и градиентное элюирование 40 объемами колонки) с получением чистого ПЭГ-rhGH класса чистоты для электрофореза (>95%). Для примера на фиг. 4 представлены электрофореграммы ПЭГ-rhGH, содержащего NPOK, и ПЭГ-rhGH, содержащего NВОК.

Другие ПЭГ-rhGH, содержащие неприродную аминокислоту согласно настоящему изобретению, также достигли класса чистоты для электрофореза после очистки.

(8) Анализ активности ПЭГ-rhGH

Конкретный процесс протекал следующим образом: Клетки HEK293-GHR (штаммы клеток, указанные в китайском патенте: 2020112649827) культивировали в среде DMEM (Gibco, номер по каталогу: 11995040), содержащей 0,1 мг/мл гигромицина В (Sangon Biotech (Шанхай) Co., Ltd., номер по каталогу: A600230-0001), 0,75 мг/мл G418 (Sangon Biotech (Шанхай) Co., Ltd., номер по каталогу: A600958-0005) и 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, номер по каталогу: 10099141), при 37 °C в 5% CO₂ до достаточного количества, и по 9×10⁴ клеток HEK293-GHR инокулировали в каждую лунку черного 96-луночного планшета для культивирования клеток (Corning, номер по каталогу: 3904), по 90 мкл/лунку, и культивировали в условиях голодания при 37°C в 5% CO₂ в течение 16 часов. Стандартный продукт rhGH (приобретенный у Национальных институтов по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами, называемый «NIFDC») и образцы rhGH, содержащего NPOK (т.е. rhGH (NPOK)), ПЭГ-rhGH с ПЭГ-модифицированной NPOK (т.е. ПЭГ-rhGH (NPOK)), ПЭГ-rhGH, содержащего NВОК (т.е. rhGH (NВОК)), ПЭГ-rhGH с ПЭГ-модифицированной NВОК (т.е. ПЭГ-rhGH (NВОК)), коммерчески доступное лекарственное средство rhGH Джинтропин® (Changchun GeneScience Pharmaceutical Co., Ltd.) и коммерчески доступное лекарственное средство ПЭГ-rhGH – пегилированный рекомбинантный человеческий соматропин для инъекций, Polyethylene Glycol Recombinant Human Somatotropin Injection® (Changchun GeneScience Pharmaceutical Co., Ltd.), градиентно разводили, получая в общей сложности девять концентраций, и культивировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 4 часов. В каждую лунку добавляли по 50 мкл реагента для детекции ONE-Glo™ (Promega, номер по каталогу: E6120) и считывали значение хемилюминесценции с помощью ридера для микропланшетов. Строили кривую зависимости значений, полученных с помощью ридера для микропланшетов, от концентрации образцов, и вычисляли EC50. Результаты приведены на фиг. 5А – фиг. 5G и в таблице 1. Результаты показали, что клеточная активность во всех точках до сопряжения была эквивалентна активности стандартного продукта rhGH от NIFDC. Клеточная активность после сопряжения была снижена, составляя приблизительно от 25% до 50% от активности стандартного продукта, и характер изменения биологической активности соответствовал имеющемуся на рынке ПЭГ-rhGH.

Клеточная активность при использовании другого ПЭГ-rhGH, содержащего неприродную аминокислоту согласно настоящему изобретению, после сопряжения также снижалась до 25–50% от активности стандартного продукта, и характер изменения биологической активности также соответствовал имеющемуся на рынке ПЭГ-rhGH.

5

Таблица 1

Название образца	EC50 (нг/мл)	Относительная активность (%)
Стандартный продукт rhGH от NIFDC	12,0	100%
rhGH (NPOK)	14,3	84%
ПЭГ-rhGH (NPOK)	44,3	27%
rhGH (NBOK)	13,0	92%
ПЭГ-rhGH (NBOK)	25,3	47%
Джинтропин®	12,6	95%
Пегилированный рекомбинантный гормон роста человека для инъекций (Polyethylene Glycol Recombinant Human Somatropin Injection®)	68,6	18%

Пример 9

10 Рекомбинантные белки GFP получали в эукариотической экспрессионной системе с неприродными аминокислотами NPOK, NPAK, NBOK, NBPK, NBGK, NPOK-2 и NBGK-2, полученными в примерах 1–7.

(1) Получение хелперной плазмиды

15 Хелперную плазмиду pCMV-MbPylRS получали из организации по сохранению плазмид Addgene (номер по каталогу: #91706); плазида кодировала аминоксил-тРНК-синтетазу, специфически распознающую неприродную аминокислоту, полученную из пирролизина, в клетках млекопитающих, и соответствующую тРНК (расознающую янтарные кодоны UAG).

(2) Конструкция вектора для экспрессии зеленого флуоресцентного белка, содержащего янтарные кодоны, внутри рамки считывания гена

20 Экспрессионный вектор, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок дикого

типа (с кодирующей последовательностью гена, представленной в SEQ ID NO: 3), содержащий метку очистки, подвергали точечной мутации с получением экспрессионной плазмиды рEGFP40 с мутированными кодонами аминокислоты в сайте 40 внутри рамки считывания, с заменой на янтарные кодоны; полная последовательность экспрессионной плазмиды рEGFP40 представлена в SEQ ID NO: 4.

Последовательность гена (SEQ ID NO: 3) зеленого флуоресцентного белка дикого типа, содержащего метку очистки, была следующей:

```
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAG
CTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGA
10 TGCCACCTAGGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGT
GCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTAC
CCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
15 GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGT
CTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCA
CAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCAT
CGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCT
GAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGC
20 CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGAAGTACGAAGATTACAAGGA
TGACGACGATAAGTAA
```

Последовательность гена (SEQ ID NO: 4) экспрессионной плазмиды рEGFP40 была следующей:

```
GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTG
25 ATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATG
GAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACC
CCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC
CATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG
TGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG
30 CATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA
GTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCG
GTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTT
TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGC
AAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAA
35 CCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGG
GACCGATCCAGCCTCCGACTCTAGAGGATCCCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGA
```

GGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAGGGCAAGCTGA
CCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGA
CCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGC
5 ACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTT
CAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGGCGACACCC
TGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGG
GGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGC
AGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC
10 GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTG
CTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAG
AAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGC
ATGGACGAGCTGTACAAGAAGTACGAAGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAAGAA
TTCCGGAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTAAACGGGGGAGGCTAACT
15 GAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAG
ACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCC
AGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCGCGT
TTCTTCCTTTTCCCCACCCCAACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCC
AACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCAGATCTGCGCAGCTGGGGCTCTAGGGGG
20 TATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCA
GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCC
TTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCATCCCTTTAGG
GTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGATGGT
TCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCA
25 CGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTC
TATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTG
ATTAACA AAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG
AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC
AGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT
30 GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACCTCCGCCATCCCGCCCCTAA
CTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAG
AGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGG
AGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATC
AAGAGACAGGATGAGGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTT
35 CTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCG
GCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGT

CAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATC
GTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGC
GGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCA
CCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACG
5 CTTGATCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAC
GTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG
GGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAG
GATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAATAATGGCC
GCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACAT
10 AGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTC
CTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCT
TGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGCGAAATGACCGACCAAGCGACGC
CCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTT
CGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTG
15 GAGTTCTTCGCCCACCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAA
TAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT
CCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATAACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGG
CGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
20 CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCT
CTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCCGGCTGCGGGCAGCGGT
ATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA
AAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
25 GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCA
AGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGA
AGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTT
TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCG
GTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCGAC
30 CGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAAGACACGACTTATC
GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC
TACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT
ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCG
GCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGC
35 GCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCA
GTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC

ACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA
ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
ATTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG
GCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCC
5 AGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGC
AACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTT
CGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACG
CTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACAT
GATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTGAG
10 AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTA
CTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTC
TGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATA
CCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCG
AAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA
15 CCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAG
GAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTC
ATACTCTTCSTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGAT
ACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGA
AAAGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCT
20 CAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGT
TGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGA
CCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGG

(3) Экспрессия рекомбинантного белка GFP с инсертированной неприродной аминокислотой

25 Клетки яичника китайского хомячка CHO-K1 (номер по каталогу: #CCL-61-ATC) приобретали в Американской коллекции типовых культур (ATCC) и культивировали адгезивным способом в среде RPMI1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. Хелперную плазмиду pCMV-MbPylRS и экспрессионную плазмиду pEGFP40 для зеленого флуоресцентного белка с описанных выше этапов экстрагировали и транзientно
30 трансфицировали клетки с использованием реагента для трансфекции Ipro2000 (компания Invitrogen, номер по каталогу: #12566014) в соответствии с инструкциями (клетки инокулировали в 24-луночный планшет по 50 000 клеток/лунку, в общей сложности использовали восемь лунок, и трансфицировали через 24 часа после инокуляции, 500 нг плазмиды на лунку). Во время трансфекции в первую лунку добавляли NPOK (до конечной
35 концентрации 1 мМ), во вторую лунку добавляли NPAK (до конечной концентрации 1 мМ), в третью лунку добавляли NBOK (до конечной концентрации 1 мМ), в четвертую лунку

добавляли NBPК (до конечной концентрации 1 мМ), в пятую лунку добавляли NBGК (до конечной концентрации 1 мМ), в шестую лунку добавляли NPOК-2 (до конечной концентрации 1 мМ), в седьмую лунку добавляли NBGК-2 (до конечной концентрации 1 мМ), а в восьмую лунку не добавляли неприродную аминокислоту для использования лунки в качестве отрицательного контроля. Наблюдение за клетками осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа через 48 часов культивирования в инкубаторе с CO₂; результаты показали, что наблюдалась очевидная зеленая флуоресценция с первой по седьмую лунку (см. фиг. 6), что подтверждает возможность инсерции неприродной аминокислоты в зеленый флуоресцентный белок с получением полного зеленого флуоресцентного белка без влияния на функцию флуоресцентного белка.

Пример 10

Моноклональные антитела против HER2, содержащие неприродные аминокислоты, получали в эукариотической экспрессионной системе, с NPOК, NPAК, NBOК, NBPК, NBGК, NPOК-2 и NBGК-2, полученными в примерах 1–7, и получали конъюгаты с токсином.

(1) Получение хелперной плазмиды

Хелперную плазмиду pCMV-MbPylRS получали из организации по сохранению плазмид Addgene (номер по каталогу: #91706); плазида кодировала аминоксил-тРНК-синтазу, специфически распознающую неприродную аминокислоту, полученную из пирролизина, в клетках млекопитающих, и соответствующую тРНК (расознающую янтарные кодоны UAG).

(2) Конструирование экспрессионного вектора для антитела против HER2 (трастузумаба), содержащего янтарные кодоны внутри рамки считывания гена

ДНК тяжелой цепи и легкой цепи (соответствующие аминокислотные последовательности были представлены SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно), кодирующие трастузумаб, синтезировали путем синтеза целого гена и субклонировали в эукариотический экспрессионный вектор pCDNA3.1+, затем в полученный экспрессионный вектор вводили точечную мутацию с получением экспрессионной плазмиды pCDNA3.1-трастузумаб-UAG142 с кодонами аминокислоты в сайте 142 в рамке считывания тяжелой цепи, мутированными в янтарные кодоны. Профиль плазмиды показан на фиг. 7, а полная последовательность плазмиды представлена в SEQ ID NO: 7.

Последовательность аминокислот тяжелой цепи (SEQ ID NO: 5) трастузумаба была следующей:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE

LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 Последовательность аминокислот легкой цепи (SEQ ID NO: 6) трастузумаба была следующей:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL
10 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Последовательность гена (SEQ ID NO: 7) экспрессионной плазмиды pCDNA3.1-
трастузумаб-UAG142 была следующей:

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCT
GATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGT
15 AGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGA
AGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACG
CGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT
AGCCCATATATGGAGTTCGCGGTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
GCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCA
20 ATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA
TGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTA
CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG
GCGTGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAAT
25 GGGAGTTTGTGGTGGCACC AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA ACTCCG
CCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
TCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACT
ATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTATGTACCGGATGCAGCTG
CTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTCGTGACCAACAGCGAAGTGCAGCTGGTG
30 GAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC
CAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAA
GGGACTGGAATGGGTGGCCAGAATCTACCCACCAACGGCTACACCAGATACGCCGA
CAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCGCCGACACCAGCAAGAACACCGCCTACCT
GCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTAGTAGATGGGG
35 AGGCGACGGCTTCTACGCCATGGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACAGTGTC
TAGTGCGTAGACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC

CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTCTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT
CCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
5 GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCCA
GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
10 CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
15 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
GAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAGTGATAAGGCCGGCCCTCTCCCTCCCCCCCCC
TAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTAT
TTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTC
20 TTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGA
ATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAG
CGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAA
AGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGA
GTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCT
25 GAAGGATGCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACA
TGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGG
ACGTGGTTTTCTTTGAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGTACCGCATGC
AACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGTCAAAACAGTGATATCCAGATG
ACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGT
30 AGAGCCAGCCAGGACGTGAACACCGCCGTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAA
GGCCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTTCTGTACAGCGGCGTGCCAGCAG
ATCAGCGGCAGCAGATCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCC
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCACTACACCACCCCCCACATTTGGCC
AGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
35 GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC
TTCTACCCAGAGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG

AAACAGCCAGGAAAGCGTGACAGAGCAGGATTCCAAGGATTCCACATACAGCCTGAG
CAGCACACTGACACTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCG
AAGTGACACACCAGGGACTGTCTCCCTGTGACAAAGAGCTTCAACAGAGGAGAA
TGCTGATGATCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTA
5 GTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGC
CACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGT
GTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG
ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAA
CCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGGCGCATTAAAGCGCGG
10 CGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCG
CTCCTTTCGCTTTCCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCGCCGTCAAGCT
CTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCA
AAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTT
TCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGA
15 ACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTCG
GCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGG
AATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATG
CAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCA
GCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCC
20 TAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATCTCCGCCCATGGC
TGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCA
GAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGC
TTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTG
AACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCT
25 ATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAG
CGCAGGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAAC
TGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAG
CTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGC
CGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGC
30 TGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAA
GCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAG
GATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTC
AAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTG
CCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGG
35 GTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCT
TGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCG

CAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTT
CGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGC
CGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATC
CTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAG
5 CTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTT
TCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATA
CCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAA
TTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCC
TGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT
10 CCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG
AGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCG
GTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA
CAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCC
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGAC
15 GAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA
AGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGC
CGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGC
TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC
ACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC
20 CAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAG
CAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGG
CTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA
AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTG
TTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
25 TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATG
AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATC
AATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGG
CACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGT
AGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCG
30 AGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGC
CGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGC
TACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCC
AACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGTCTCCTT
35 CGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGG
CAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT

GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCC
CGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCAT
TGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGT
TCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGT
5 TTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGA
CACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCSTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGG
GTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGG
GTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

(3) Инсерция неприродной аминокислоты

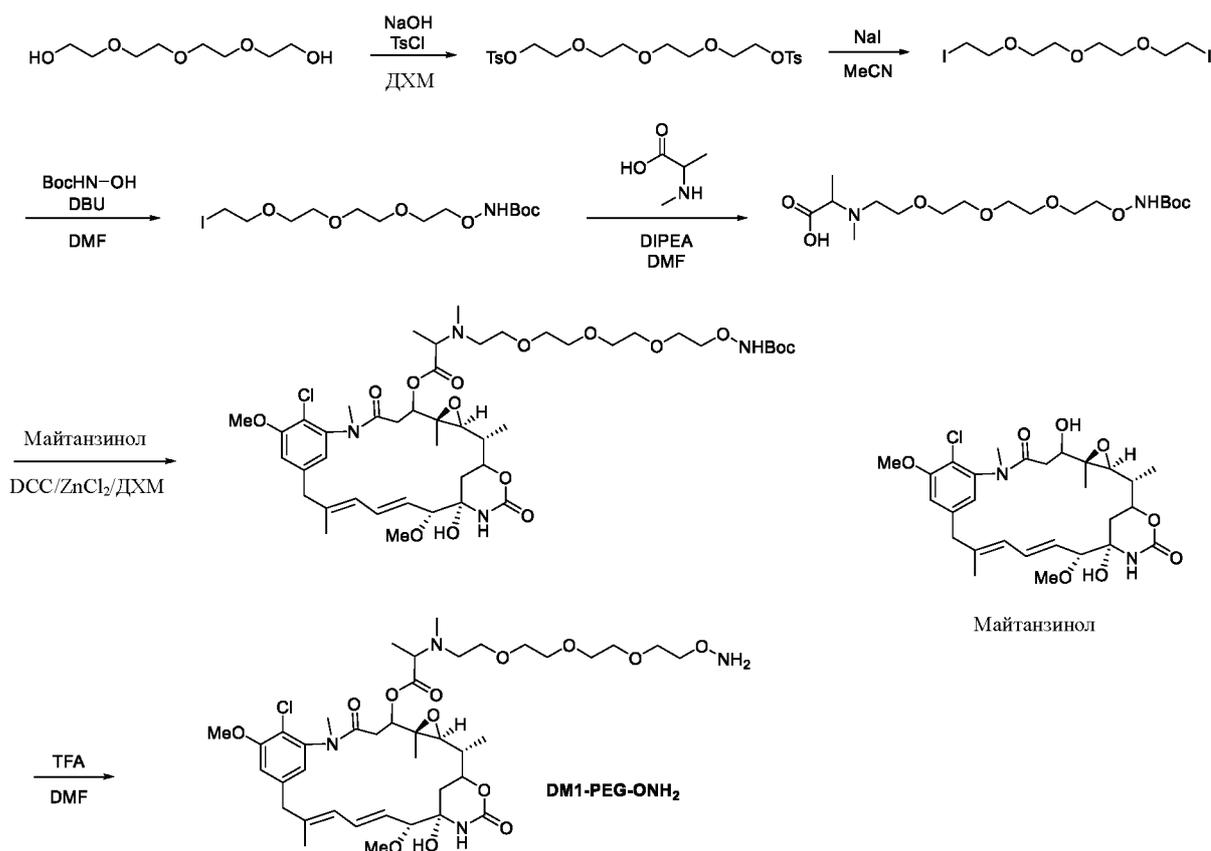
10 Клетки HEK293, адаптированные к суспензии, инокулировали в среду Wayne293™
(Quacell Biotechnology, номер по каталогу: A21501) с плотностью $0,3 \times 10^5$ /мл и
культивировали при встряхивании в 1 л встряхиваемой колбе с 240 мл среды в условиях 120
об/мин, 5% CO₂ и 80% влажности. Клетки трансфицировали, когда плотность клеток
достигала около 1×10^6 /мл, экстрагировали хелперную плазмиду pCMV-MbPylRS и
15 экспрессионную плазмиду pCDNA3.1-трастузумаб-UAG142 согласно описанию этапов (1)
и (2), и извлекали эндотоксин для последующего использования. В ходе трансфекции в
каждой встряхиваемой колбе использовали 120 мкг экспрессионной плазмиды и 120 мкг
хелперной плазмиды, добавляли в центрифужную пробирку и разводили до 7,2 мл 1×
буфером ФСБ, а затем добавляли 720 мкг реагента для трансфекции PEI (полиэтиленимин)
20 в другую центрифужную пробирку и добавляли 1× буфер ФСБ для разведения до 7,2 мл. Две
центрифужные пробирки, соответственно, оставляли на 5 минут после перемешивания до
однородности, а затем жидкости в двух центрифужных пробирках осторожно перемешивали
до однородности и снова оставляли на 10 минут; медленно по каплям добавляли в 240 мл
25 суспензии клеток во встряхиваемой колбе объемом 1 л в общей сложности 14,4 мл, при
непрерывном осторожном встряхивании во время добавления по каплям, культивировали
при встряхивания в условиях 120 об/мин, 5% CO₂ и 80% влажности в течение 4 часов, затем
добавляли неприродную аминокислоту до конечной концентрации 1 мМ и непрерывно
культивировали в условиях 120 об/мин, 5% CO₂ и 80% влажности в течение 5 дней; собирали
супернатант клеточной культуры для очистки антител.

(4) Очистка

30 Супернатант клеточной культуры очищали на предварительно заполненной 1 мл белка
А NiTrap колонке и элюировали буфером для элюирования, содержащим 100 ммоль/л
глицина и 200 ммоль/л ацетата при pH 3,5, с получением очищенного трастузумаба с
инsertированной неприродной аминокислотой.

(5) Сопряжение

35 Путь синтеза был следующим (на примере NBOK):



Процесс сопряжения включал следующие конкретные операции: очищенный трастузумаб с инсертированной неприродной аминокислотой смешивали и разводили с DM1-PEG-OH₂ в молярном соотношении 1:15, затем доводили значение pH до 4,0 10 М уксусной кислотой, смесь встряхивали на шейкере (25°C, 200 об/мин), отбирали образцы через 48 часов и детектировали статус реакции с трастузумабом с помощью ВЭЖХ (ГФХ-ВЭЖХ) на основе принципа гидрофобной хроматографии. Результаты показали, что 93,0% трастузумаба, содержащего NВРК, было модифицировано токсином, 93,0% трастузумаба, содержащего NВОК, было модифицировано токсином, и 87,4% трастузумаба, содержащего NРОК-2, было модифицировано токсином, как показано на фиг. 8А–8С. Коэффициент сопряжения для трастузумаба = 100% - коэффициент для оставшихся несопряженных исходных материалов.

Конъюгат сопряженного моноклонального антитела с токсином подвергали замене буфера, используя ультрафильтрационную центрифужную пробирку с отсечкой 50 кДа для удаления непрореагировавшего исходного материала токсина; буфер для замены представлял собой 20 мМ гистидиновый буфер (pH 6,5).

Использовали следующие условия анализа ГФХ-ВЭЖХ:

подвижная фаза А (2 М сульфат аммония, 75 мМ К₂НРО₄, pH 7,2±0,2); и

подвижная фаза В (75 мМ К₂НРО₄, 25% изопропанол, pH 7,2±0,2).

Хроматографическая колонка	Колонка TSKgel Butyl-NPR, 4,6 × 100 мм, 2,5 мкм		
Длина волны детектирования	280 нМ		
Температура термостата колонки	40°C		
Температура инжектора образцов	5°C		
Скорость потока	0,5 мл/мин		
Объем образца	10 мкл		
Градиентное элюирование	Время (мин)	А (%)	В (%)
	0	80	20
	30	40	60
	35	25	75
	40	25	75
	45	80	20
	60	80	20

(6) Анализ активности

Для детекции ингибиторного действия образца на пролиферацию клеток использовали клеточные штаммы ВТ-474 (АТСС, номер по каталогу: НТВ-20).

- 5 Конкретный процесс протекал следующим образом: Клетки ВТ-474 культивировали в среде АТСС Hybri-Care (АТСС, номер по каталогу: 46-Х), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, номер по каталогу: 10099141) в условиях 37°C и 5% CO₂ в достаточном количестве, 1,5×10⁴ клеток ВТ-474 инокулировали в каждую лунку 96-луночного планшета для культивирования клеток (Corning, номер по каталогу: 3599)
- 10 (включая контрольную лунку с носителем), в холостую контрольную лунку добавляли бесклеточную среду, 80 мкл/лунку. Проводили градиентное разведение трастузумаба, содержащего NВОК, и DM1-модифицированного трастузумаба, содержащего NВОК, от 17 мкг/мл до 0,13 мкг/мл, получая в общей сложности восемь концентраций и используя две лунки-репликата для каждой концентрации. Разведенный образец переносили в
- 15 культуральный планшет, инокулированный клетками ВТ-474, по 10 мкл/лунку, добавляли по 10 мкл среды в контрольную лунку с основой и холостую контрольную лунку, соответственно, и культивировали в условиях 37°C и 5% CO₂. На пятые сутки в каждую лунку добавляли по 10 мкл реагента для детекции ССК-8 (Beuyotime, номер по каталогу:

С0043), проявляли в условиях 37°C и 5% CO₂ в течение 6 часов и считывали оптическую плотность с помощью ридера для микропланшетов при длине волны 450 нм. Ингибирование роста под действием детектированного образца рассчитывали по следующей формуле: ингибирование роста (%) = (OD соединения – OD холостого контроля) / (OD контрольного носителя – OD холостого контроля) × 100%. Ингибирование роста под действием соединений с различными концентрациями рассчитывали в Excel, а затем с помощью программного обеспечения GraphPad Prism7 строили кривую ингибирования роста и рассчитывали IC50. Результаты представлены на фиг. 9. Результаты показали, что IC50 DM1-модифицированного трастузумаба, содержащего NВОК, была примерно в три раза ниже IC50 трастузумаба, содержащего NВОК, таким образом, эффект уничтожения опухоли был значительно улучшен.

(7) Исследование стабильности DM1-модифицированного трастузумаба, содержащего неприродную аминокислоту

Конъюгат сопряженного моноклонального антитела с токсином подвергали замене буфера, используя ультрафильтрационную центрифужную пробирку с отсечкой 50 кДа (Millipore, номер по каталогу: UFC905024#) для удаления непрореагировавшего исходного материала токсина. Буфер для замены представлял собой 20 мМ гистидиновый буфер (рН 6,0). Раствор белка разделяли на три части, доводили значение рН до 4,0, 6,0 и рН 8,0 1 М раствором лимонной кислоты или 1 М раствором Tris, соответственно, помещали на водяную баню при 25°C, отбирали образцы через 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов и 120 часов, соответственно, и анализировали с помощью ГФХ-ВЭЖХ (при таких же условиях детекции, как описанные выше). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Стабильность DM1-модифицированного трастузумаба, содержащего NВОК, при 25°C при различных значениях рН

Время взятия образцов	Содержание несопряженного трастузумаба, содержащего NОПК/%		
	рН 4,0	рН 6,0	рН 8,0
0 часов	7,0%		
24 часа	7,3%	7,50%	7,61%
48 часов	9,2%	7,50%	7,50%
72 часа	11,5%	7,62%	7,63%
96 часов	13,8%	7,68%	7,71%
120 часов	15,2%	7,50%	7,61%

Результаты в таблице 2 показали, что оксимная связь, образующаяся в DM1-

модифицированном трастузумабе, содержащем неприродную аминокислоту согласно настоящему изобретению, оставалась относительно стабильной при низком значении pH.

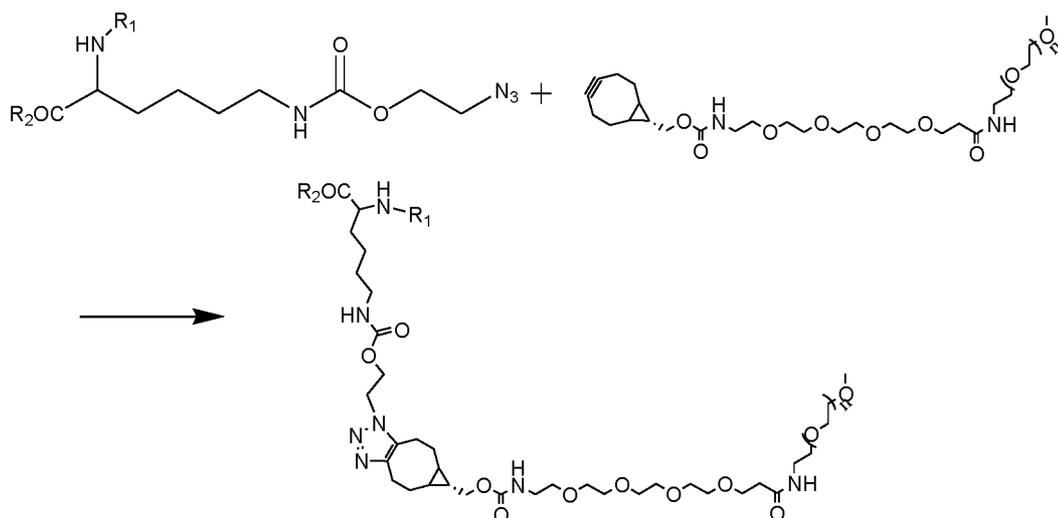
Пример 11. Восстановление активной группы Lys-азидо

5 (1) Анализ молекулярной массы продукта с помощью масс-спектрометрии с высоким разрешением

Согласно способу экспрессии секреторного гормона роста, описанному в источнике (Lihua Song, et al., Journal of Biology, 16 (1): 6-8, 1999), к N-концу rhGH в экспрессионном векторе добавляли кодирующую последовательность сигнального пептида OmpA, в
10 соответствии с последовательностью сигнального пептида, представленной в источнике, и в комбинации с хелперной плазмидой pSupAR-MbPylRS из примера 8 конструировали экспрессирующий штамм rhGH OrigamiB (DE3) с кодонами K140, мутированными в янтарные кодоны (TAG). Природный rhGH с мутацией в Lys-азидо в сайте 140 экспрессировали путем добавления Lys-азидо во время ферментации; указанный rhGH был
15 назван rhGH-Lys-азидо-140. Природный rhGH с мутацией в NВОК в сайте 140 экспрессировали путем добавления NВОК во время ферментации; указанный rhGH был назван rhGH-NВОК-140. Кроме того, проводили очистку с помощью соответствующих способов очистки, описанных в вышеуказанном источнике. Полные молекулярные массы rhGH-Lys-азидо-140 и rhGH-NВОК-140 анализировали с помощью жидкостной
20 хроматографии – масс-спектрометрии (масс-спектрометр высокого разрешения: XevoG2-XS Q-ToF, Waters Corporation; ультраэффективная жидкостная хроматография: система УЭЖХ (Acquity UPLC I-Class), Waters Corporation).

Как показано на фиг. 10А, компонент с молекулярной массой, которая была на 26 Да меньше теоретической молекулярной массы (22 265 Да), был обнаружен в образце rhGH-
25 Lys-азидо-140, и указанный компонент был определен как продукт восстановления азидной структуры ($-N_3$) на конце Lys-азидо в ($-NH_2$), что указывало на нестабильность азидной группы при инсерции в белок обычной неприродной аминокислоты Lys-азидо, и ее легкое восстановление с образованием продукта восстановления, с утратой таким образом активности сопряжения. Как показано на фиг. 10В, образец rhGH-NВОК-140 не имел
30 высокой доли примесей, что указывает на более высокую стабильность рекомбинантного белкового продукта, полученного с использованием NВОК, относительно продукта, полученного с использованием Lys-азидо.

(2) Сравнение эффективности сопряжения



Как показано в приведенном выше описании пути реакции, 30 кДа БЦН-ПЭГ (получен самостоятельно в соответствии с китайским патентом CN112279906A) сопрягали с rhGH-Lys-азидо-140 сайт-специфическим образом с помощью клик-реакции (где направление от R₁ до R₂ представляло собой направление от N-конца к C-концу последовательности аминокислот). Концентрацию полученного согласно описанию выше целевого белка доводили до 0,5 мг/мл с использованием буфера ФСБ с pH 7,0, порошок БЦН-ПЭГ добавляли в раствор rhGH-Lys-азидо в соотношениях 1:15 и 1:25 (молярные соотношения рекомбинантного белка к 30 кДа БЦН-ПЭГ), соответственно, и тщательно встряхивали для растворения с получением прозрачного бесцветного раствора, затем реакционный раствор закрывали и встряхивали для проведения реакции в шейкере с постоянной температурой (25°C, 70 об/мин). Образцы отбирали и результаты реакции детектировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза через регулярные интервалы времени; реакцию останавливали через 72 часа при коэффициенте конверсии, равном приблизительно 50% – 70%. Результаты реакции представлены на фиг. 11А.

В соответствии с примером 8, 30 кДа аминокси-ПЭГ сопрягали с rhGH-NBOK-140 сайт-специфическим образом посредством реакции оксимирования. Образцы отбирали и результаты реакции детектировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза через регулярные интервалы времени; реакцию останавливали через 48 часов при коэффициенте конверсии, равном приблизительно 90%. Результаты реакции представлены на фиг. 11В.

В сочетании с результатами детекции молекулярных масс с помощью масс-спектрометрии с высоким разрешением можно сделать вывод, что снижение уровня Lys-азидо приводило к невозможности сопряжения продукта с БЦН-ПЭГ, со снижением таким образом коэффициента сопряжения. Однако при сопряжении рекомбинантного белка, содержащего неприродную аминокислоту согласно настоящему изобретению, с ПЭГ, коэффициент конверсии был очевидно выше, чем коэффициент конверсии рекомбинантного белка, содержащего Lys-азидо, и время реакции также очевидно сокращалось, с очевидным улучшением, соответственно, эффективности реакции.

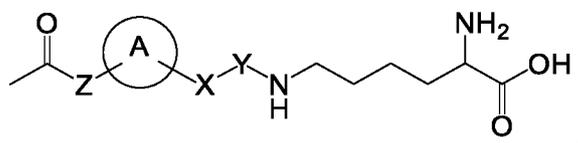
Если не указано иное, термины, используемые для описания настоящего изобретения,

имеют значения, общеизвестные для специалистов в данной области техники.

5 Описанные варианты реализации настоящего изобретения предназначены исключительно для предоставления примеров и не предназначены для ограничения объема защиты настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники смогут осуществлять различные другие замены, изменения и усовершенствования в пределах объема настоящего изобретения. Следовательно, настоящее изобретение не ограничено вышеуказанными вариантами реализации, а ограничено исключительно формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Неприродная аминокислота, представляющая собой соединение со структурой, представленной формулой (I), или его энантиомер,



I

где каждый из X и Z независимо представляет собой замещенный или незамещенный C0-C20 линейный или разветвленный алкилен, один или более -CH₂- необязательно замещен(ы) одним или более из -O-, -S-, -NH-, -C(O)- и -S(O)-, Y представляет собой -C(O)-, -S(O)- или -CH₂-, и A представляет собой замещенный или незамещенный C6-C20 арил; и

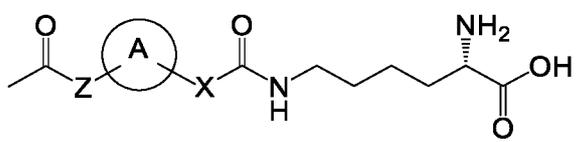
если каждый из X, Z и A независимо представляет собой заместитель, указанный заместитель выбран из одного или более из гидроксила, сульфгидрила, галогена, нитро, циано, алкила, алкенила, алкинила, алкокси, ацила, ациламино, карбоксила, сложного эфира, амино, сульфонила, сульфинила, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

2. Неприродная аминокислота по п. 1, где заместитель выбран из одного или более из гидроксила, сульфгидрила, галогена, нитро, циано, C1-C6 алкила, C1-C6 алкокси, ацила, ациламино, карбоксила, сложного эфира, амино, сульфонила, сульфинила, C3-C8 циклоалкила, C3-C8 гетероциклила, C6-C20 арила и C4-C10 гетероарила;

предпочтительно, каждый из X и Z независимо представляет собой линейный или разветвленный C0-C10 алкилен и предпочтительно представляет собой линейный C0-C6 алкилен, и один или более -CH₂- необязательно замещен(ы) одним или более из -O-, -S- и -NH-; и более предпочтительно, X и Z не являются одновременно C0 алкиленом; и/или

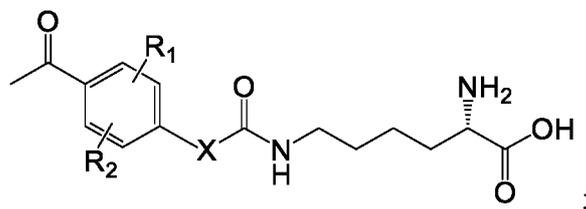
A представляет собой замещенный или незамещенный C6-C10 арил; более предпочтительно, A представляет собой замещенный или незамещенный фенил или нафтил.

3. Неприродная аминокислота по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что она представляет собой соединение со структурой, представленной формулой (I-1),



I-1

где каждый из X, Y и A независимо соответствуют определенным в п. 1 или 2;
предпочтительно, указанная неприродная аминокислота представляет собой
соединение со структурой, представленной формулой (I-2),



5

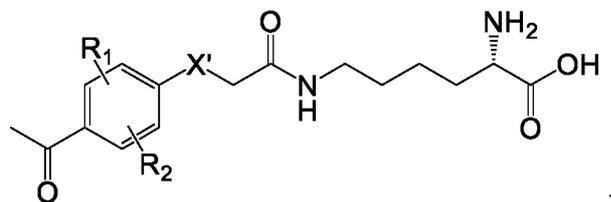
I-2

где X определен в п. 1 или п. 2; и

каждый из R₁ и R₂ независимо представляет собой водород, гидроксил, сульфгидрил,
галоген, нитро, циано, C1-C6 алкил, C1-C6 алкокси, ацил, ациламино, карбоксил, сложный
эфир, amino, сульфонил, сульфинил, C3-C8 циклоалкил, C3-C8 гетероциклил, C6-C20 арил
или C4-C10 гетероарил.

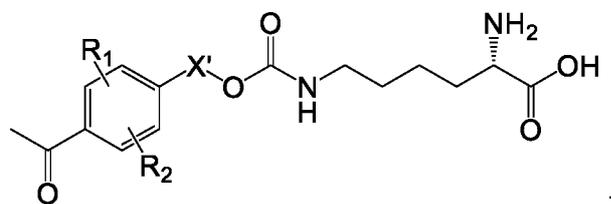
10

4. Неприродная аминокислота по п. 3, отличающаяся тем, что она представляет собой
соединение со структурой, представленной формулой (I-3), формулой (I-4), формулой (I-5)
или формулой (I-6),

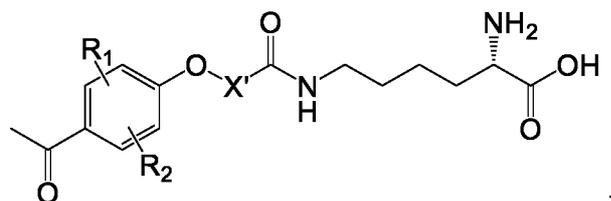


15

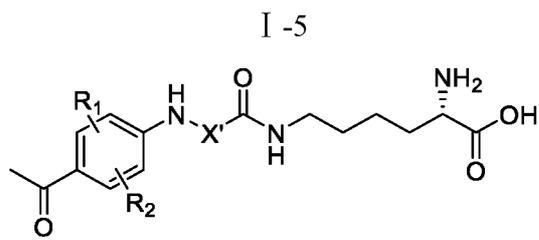
I -3



I -4



20



I -6

5 где X' представляет собой C0-C6 линейный алкилен, предпочтительно представляет собой C0-C4 линейный алкилен, и один или более -CH2- необязательно замещены -O- и/или -NH-; и

каждый из R₁ и R₂ независимо соответствует определению в п. 3.

10 5. Неприродная аминокислота по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что она представляет собой соединение, имеющее одну из следующих структур:

(1)	
(2)	
(3)	
(4)	

(5)	
(6)	<p style="text-align: right;">или</p>
(7)	

6. Применение неприродной аминокислоты по любому из пп. 1-5 для получения рекомбинантного белка или конъюгата рекомбинантного белка; предпочтительно, указанный рекомбинантный белок представляет собой рекомбинантный гормон роста человека; или, предпочтительно, указанный конъюгат рекомбинантного белка представляет собой конъюгат рекомбинантного гормона роста человека с полиэтиленгликолем.

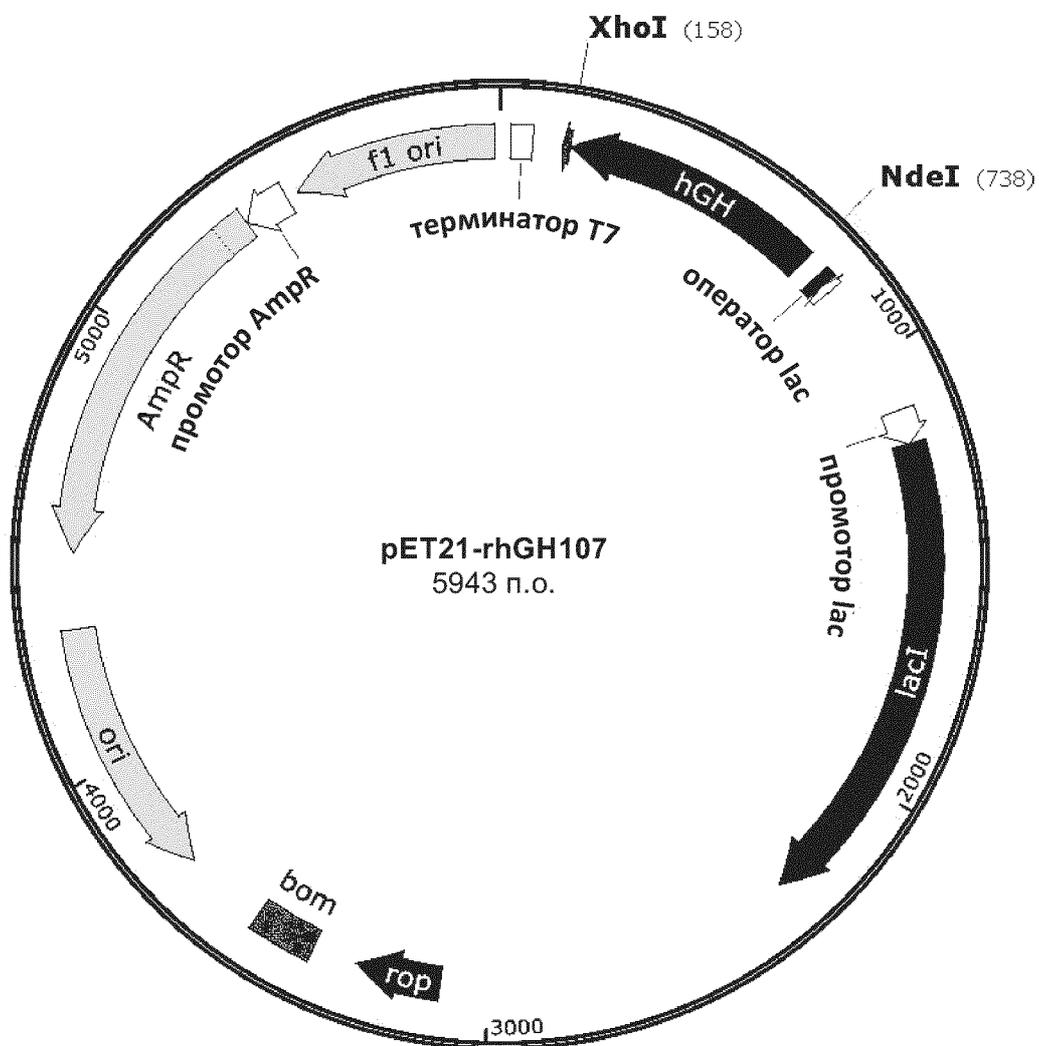
7. Рекомбинантный белок, при этом по меньшей мере один сайт в последовательности аминокислот указанного рекомбинантного белка представляет собой неприродную аминокислоту по любому из пп. 1-5.

8. Конъюгат рекомбинантного белка, при этом указанный конъюгат рекомбинантного белка получен путем образования оксимной связи между концевым карбонилем неприродной аминокислоты в рекомбинантном белке по п. 7 и фрагментом для сопряжения, содержащим концевую группу "NH₂-O-".

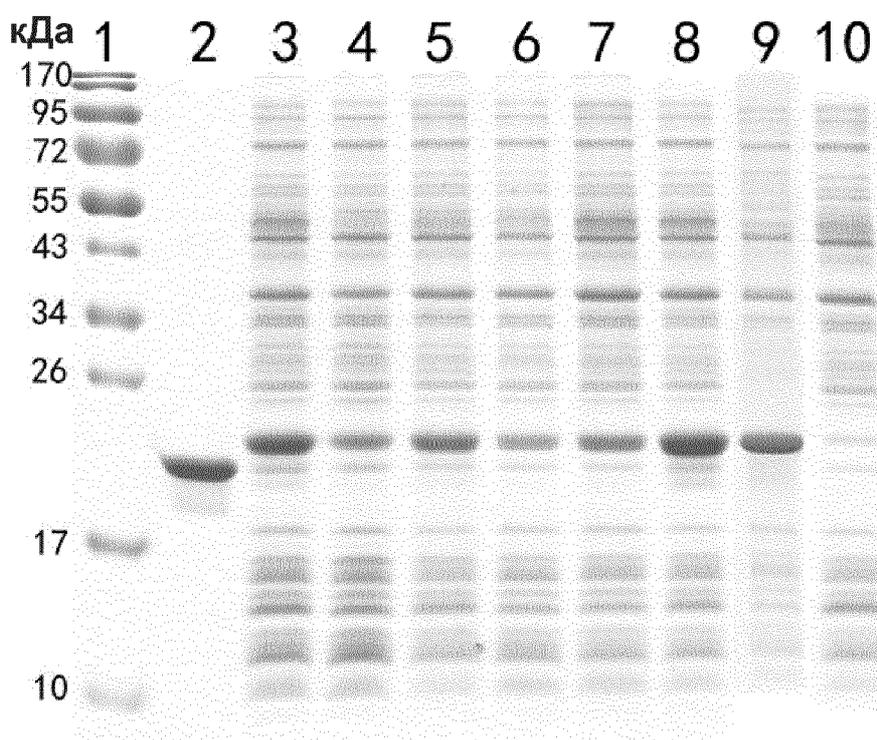
9. Конъюгат рекомбинантного белка по п. 8, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный белок представляет собой рекомбинантный гормон роста человека, фрагмент для сопряжения, содержащий концевую группу "NH₂-O-", представляет собой полиэтиленгликоль, содержащий концевую группу "NH₂-O-", и предпочтительно представляет собой полиэтиленгликоль с молекулярной массой от 10 кДа до 100 кДа; более предпочтительно, последовательность аминокислот рекомбинантного гормона роста человека соответствует представленной в SEQ ID NO: 1; более предпочтительно,

соответствующий сайт 107 в последовательности аминокислот SEQ ID NO: 1 содержит неприродную аминокислоту по любому из пп. 1-5.

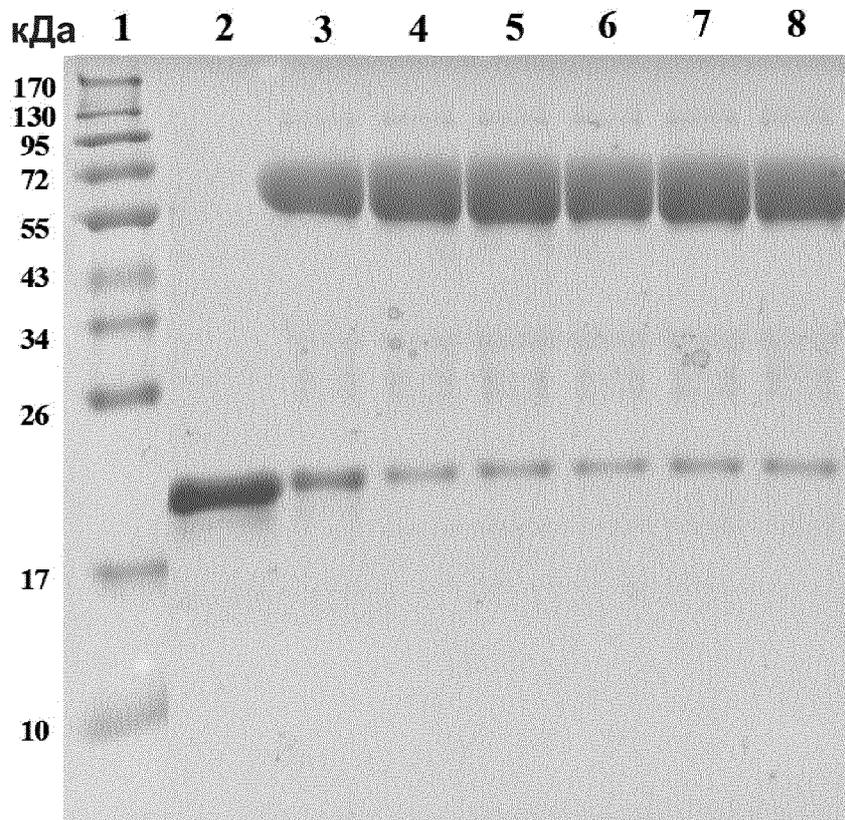
5 10. Применение конъюгата рекомбинантного белка по п. 9 для получения лекарственного средства для лечения нарушений роста и развития, вызванных недостаточностью секреции эндогенного гормона роста, нарушений роста и развития, вызванных синдромом Тернера или дефицитом гормона роста у взрослых.



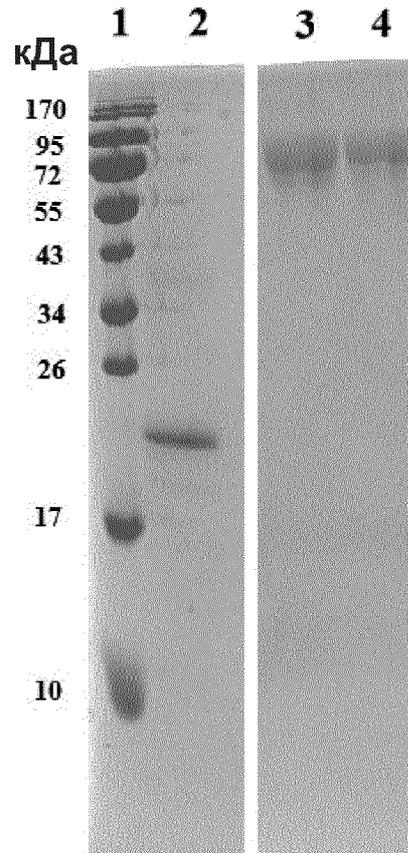
Фиг. 1



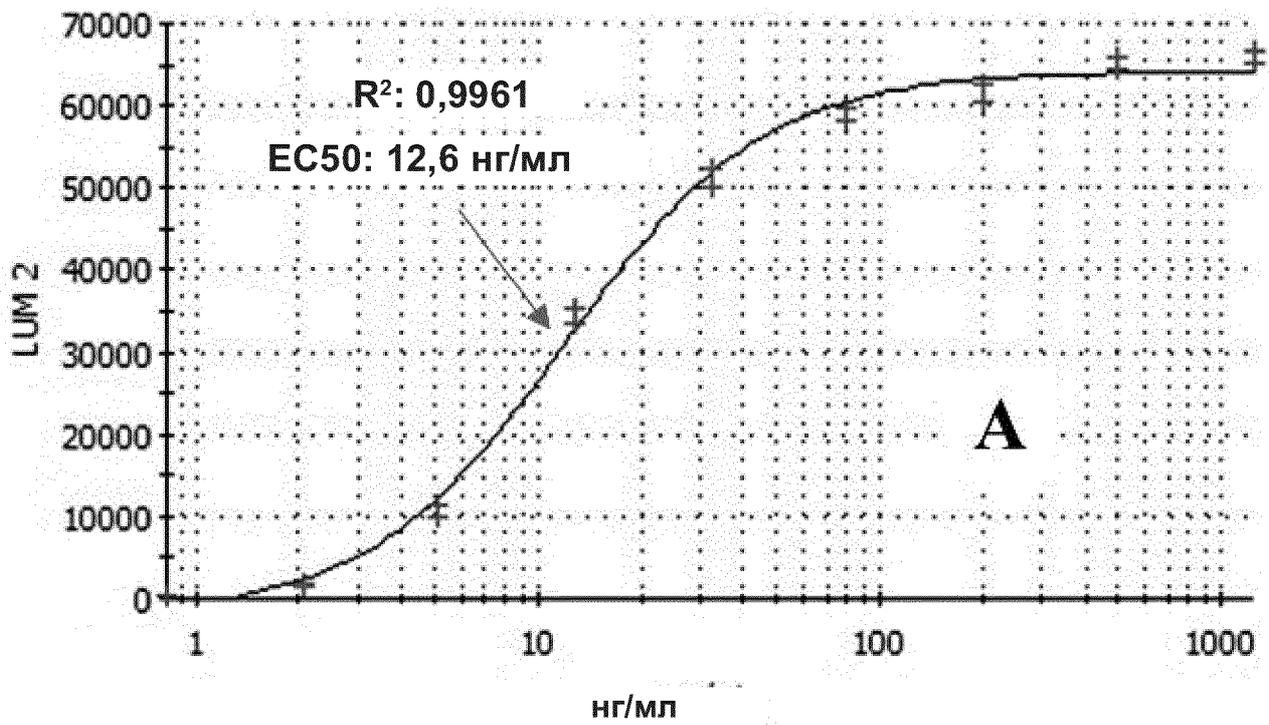
Фиг. 2



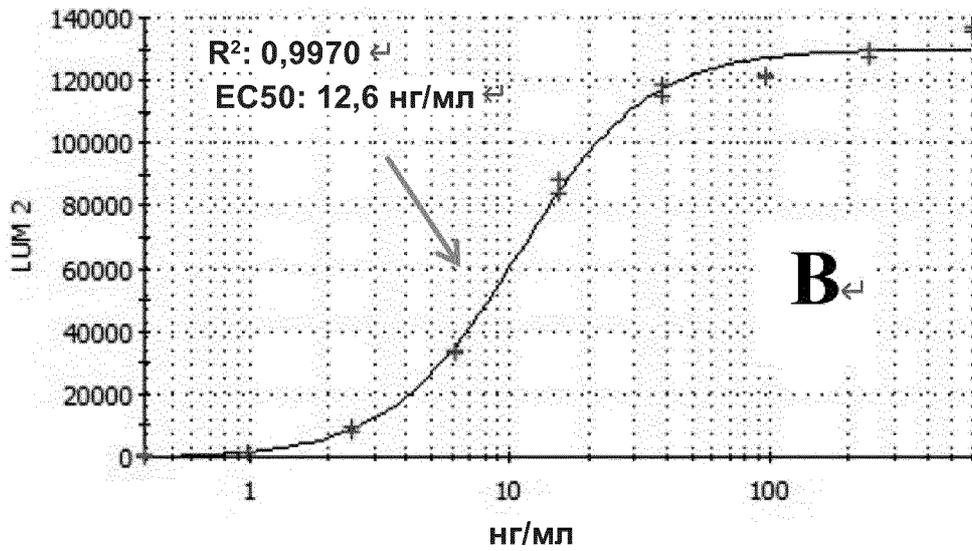
Фиг. 3



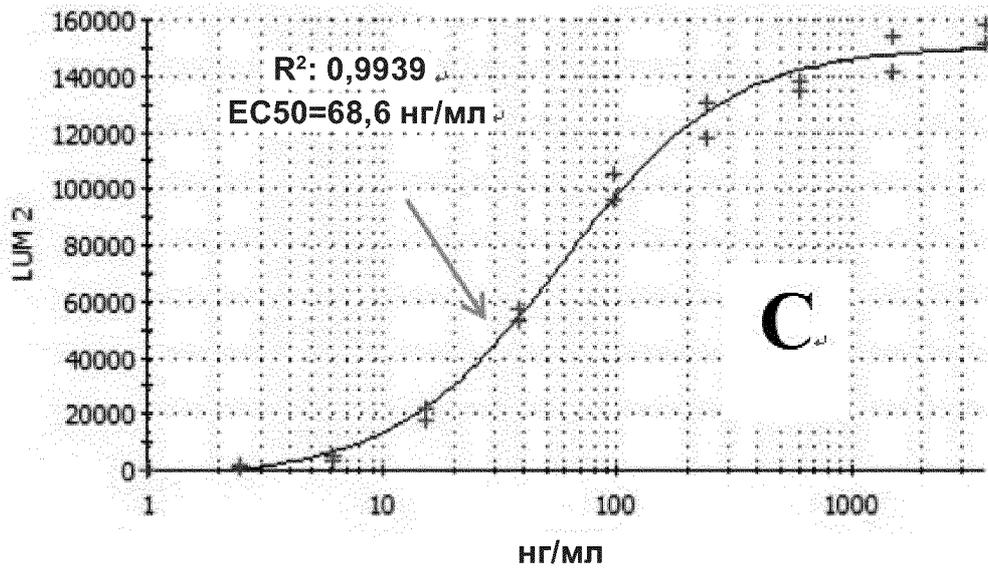
Фиг. 4



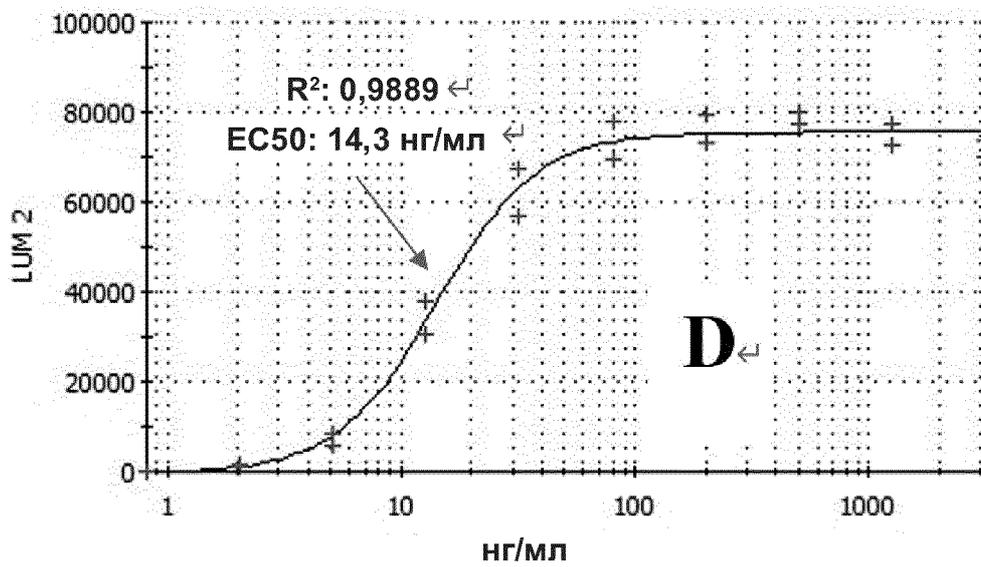
Фиг. 5А



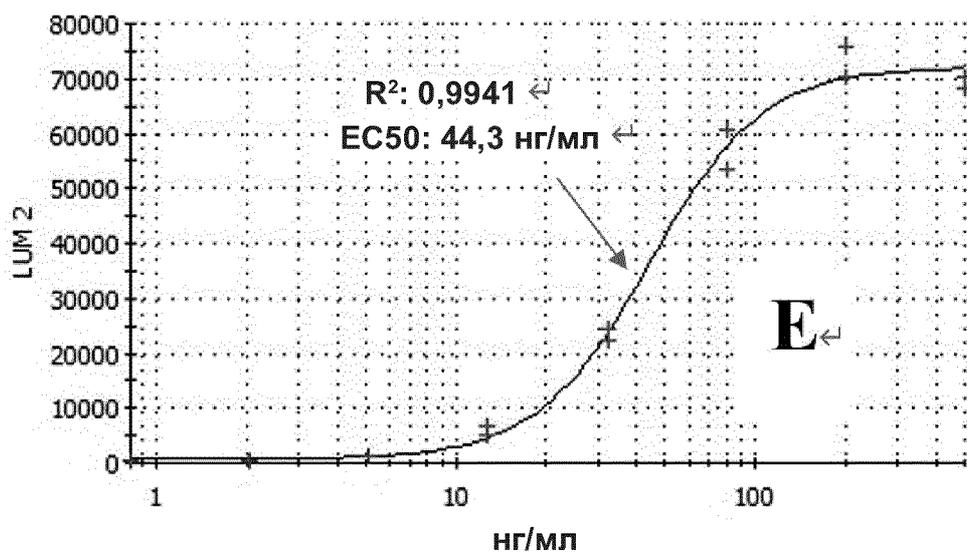
Фиг. 5B



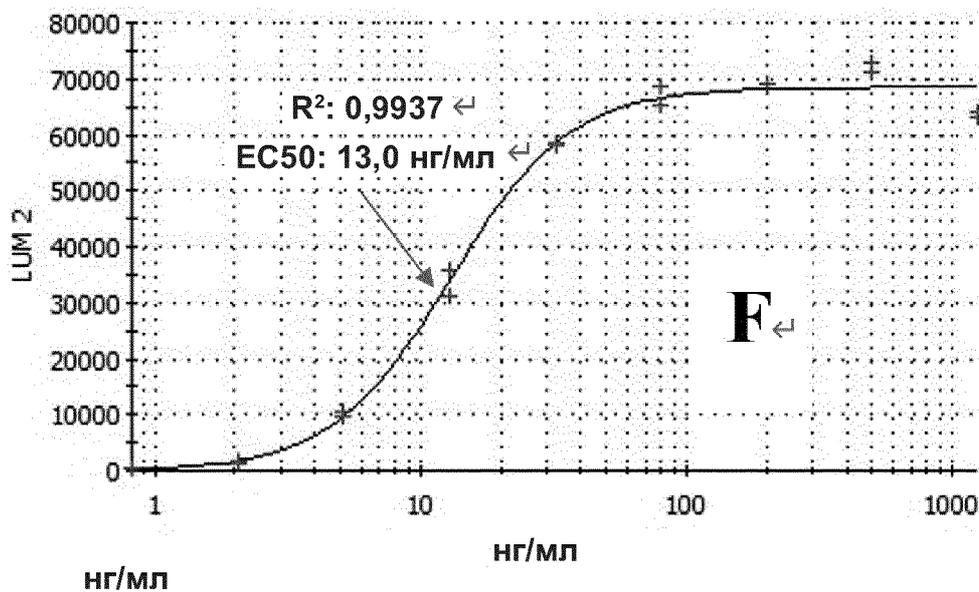
Фиг. 5C



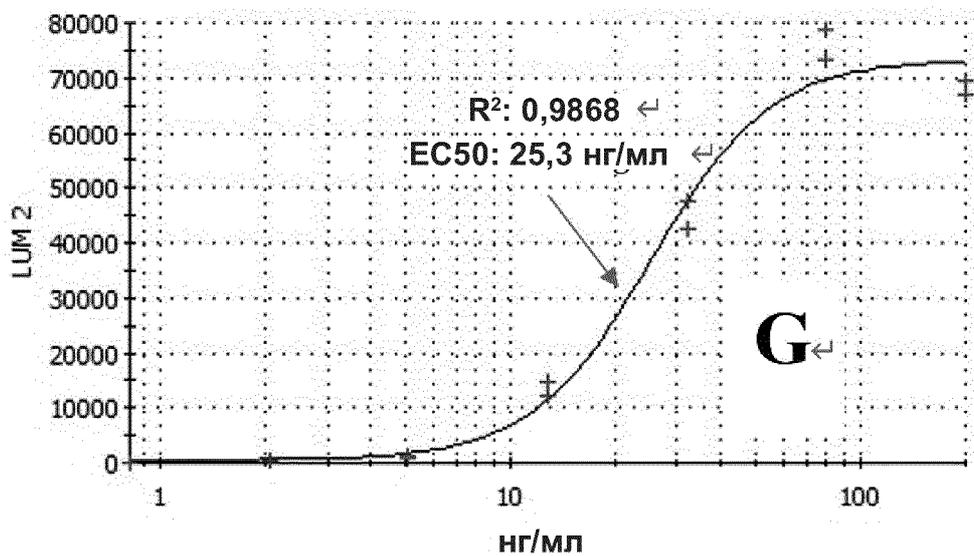
Фиг. 5D



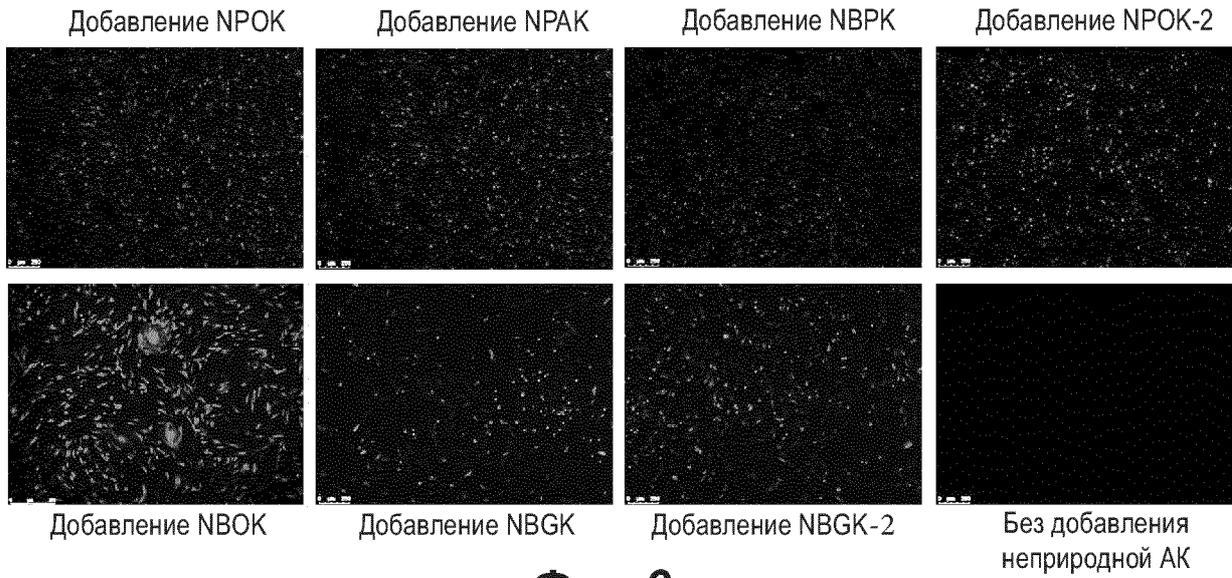
Фиг. 5Е



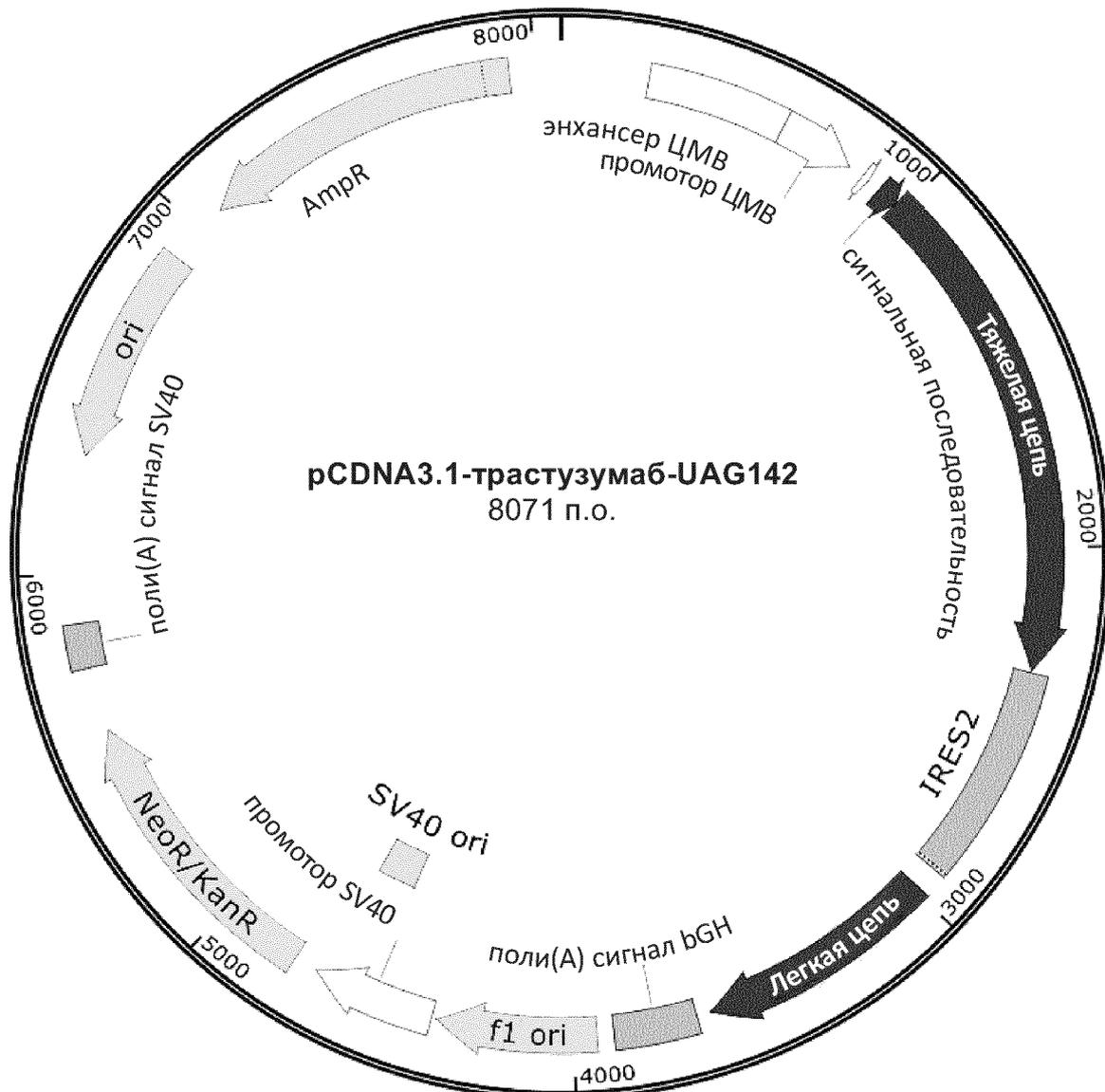
Фиг. 5F



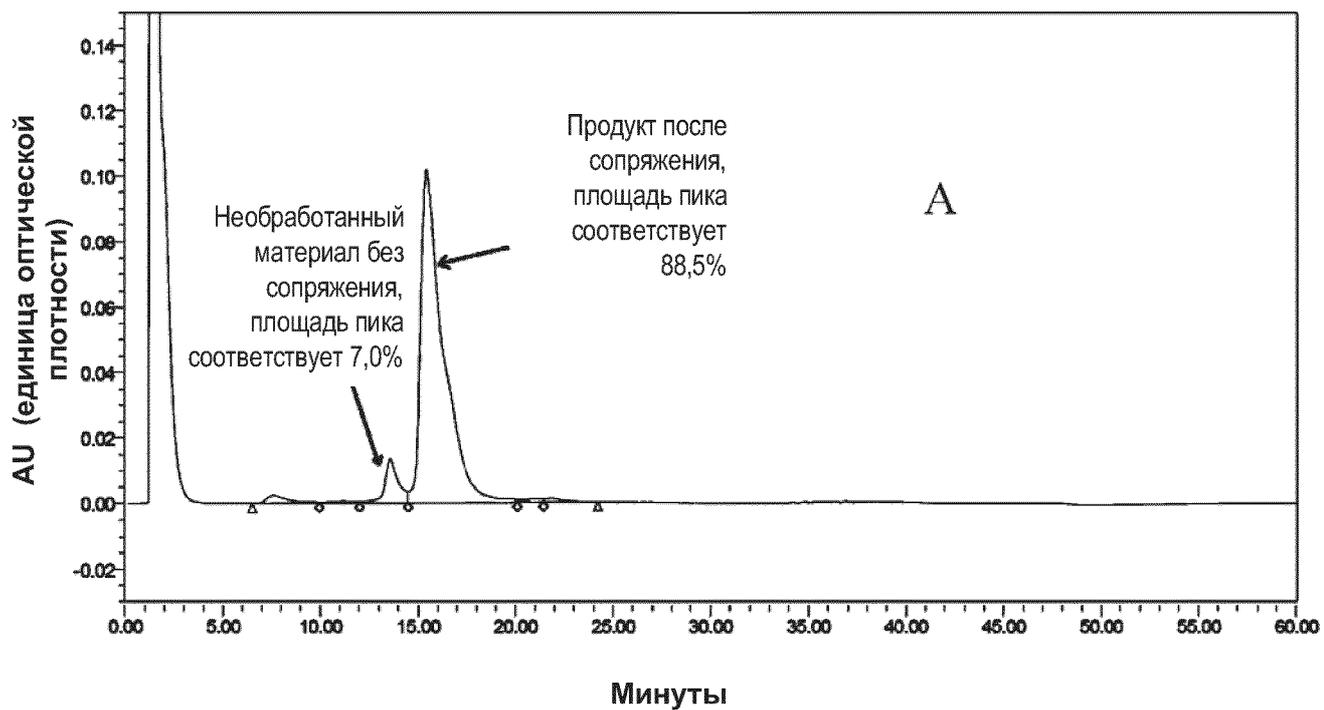
Фиг. 5G



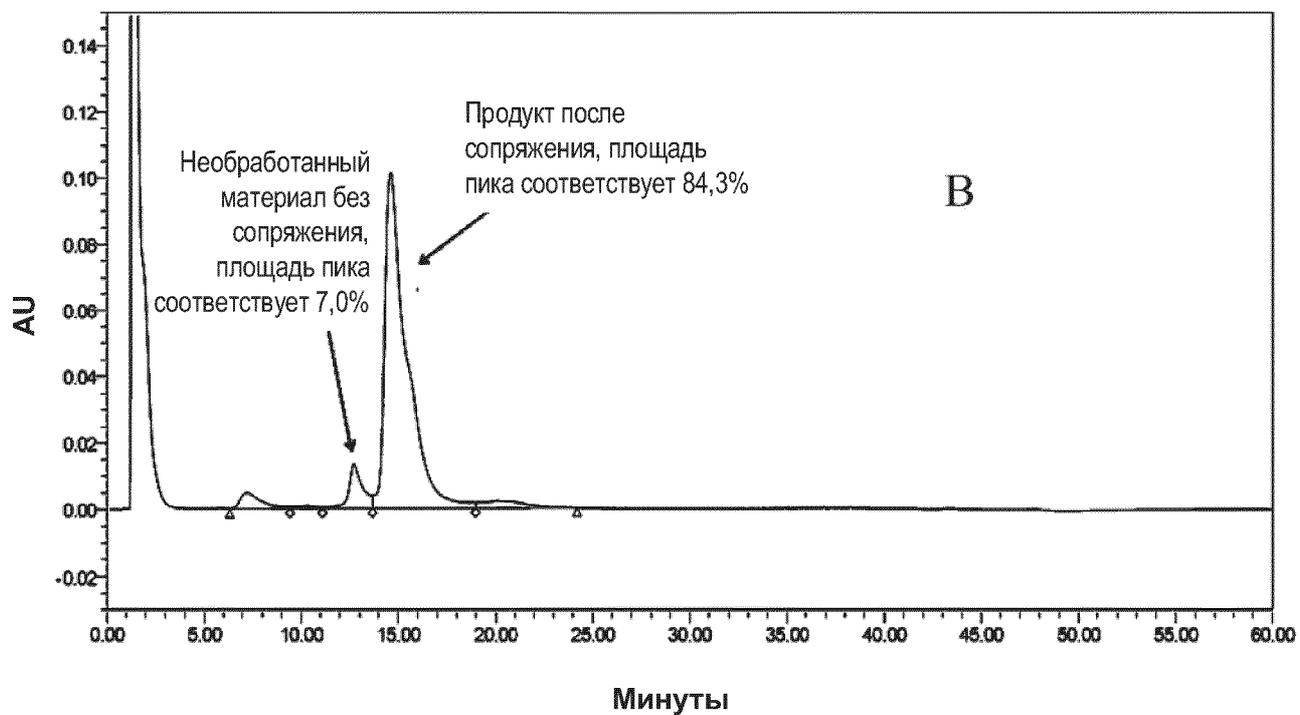
Фиг. 6



Фиг. 7



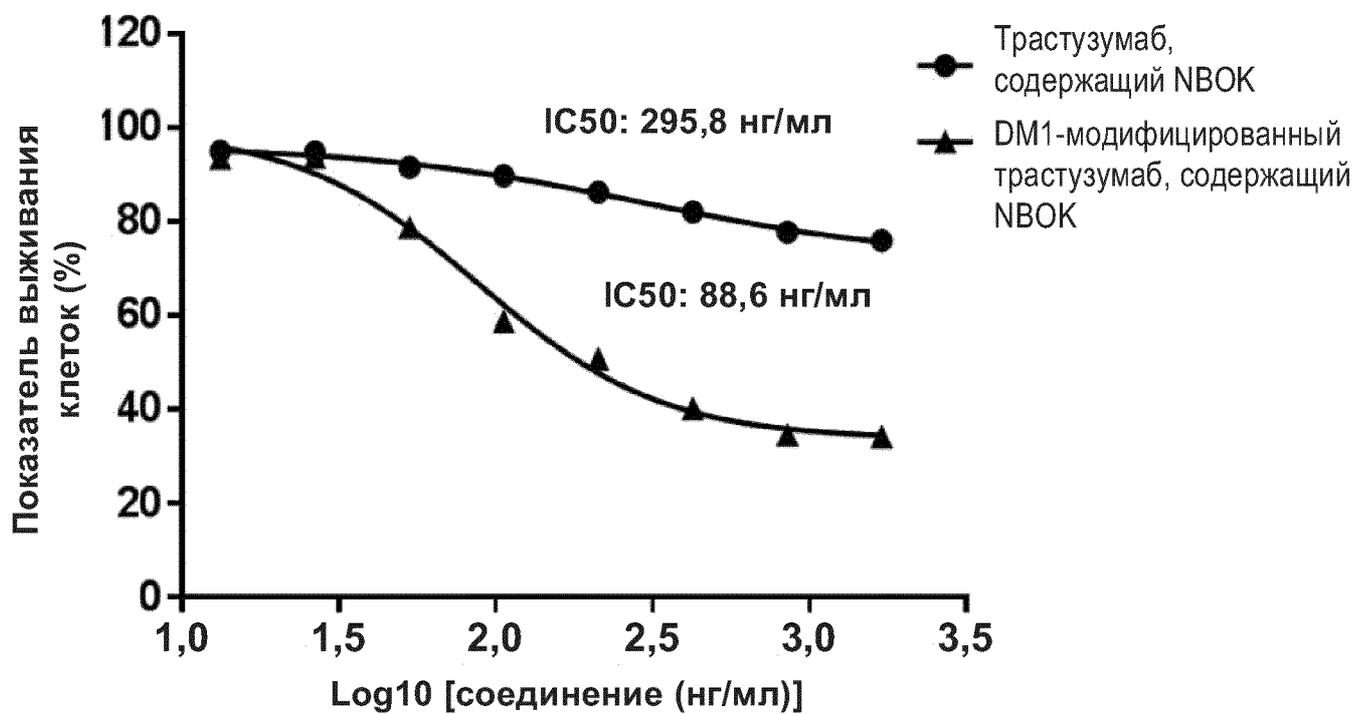
Фиг. 8А



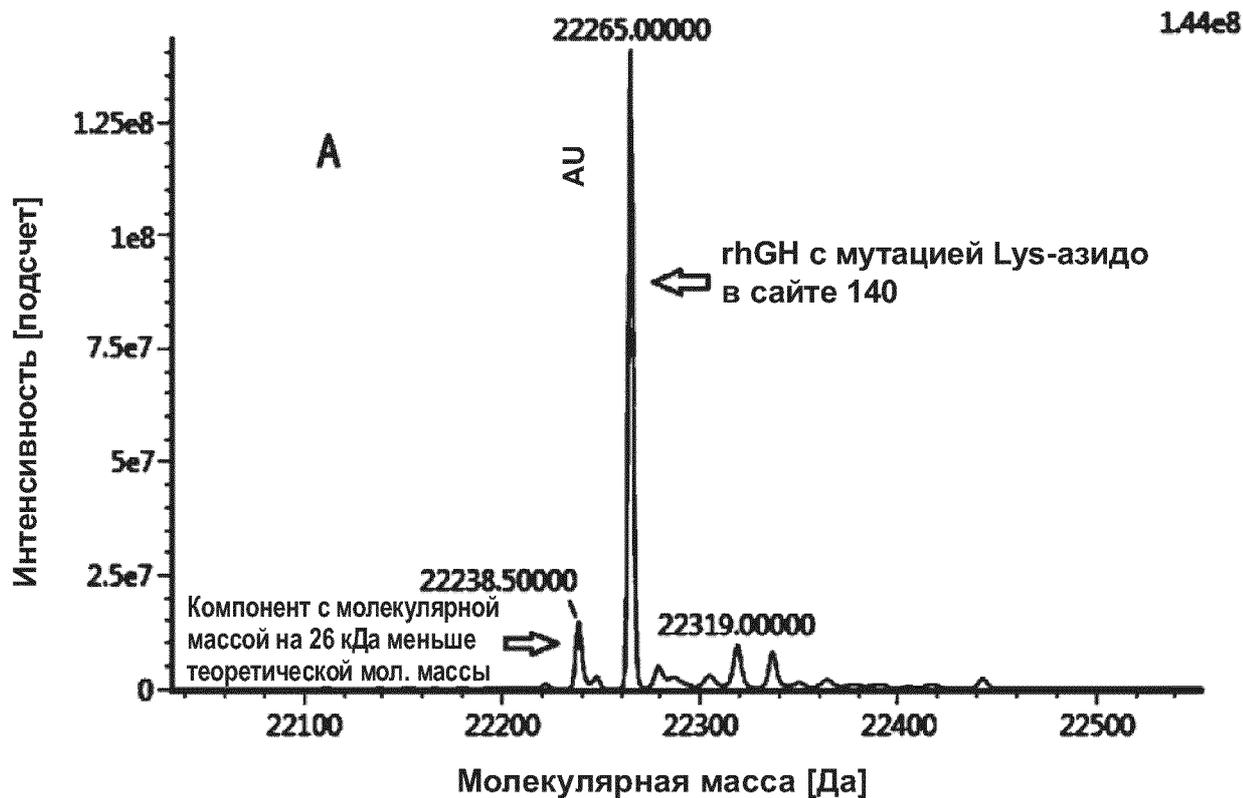
Фиг. 8В



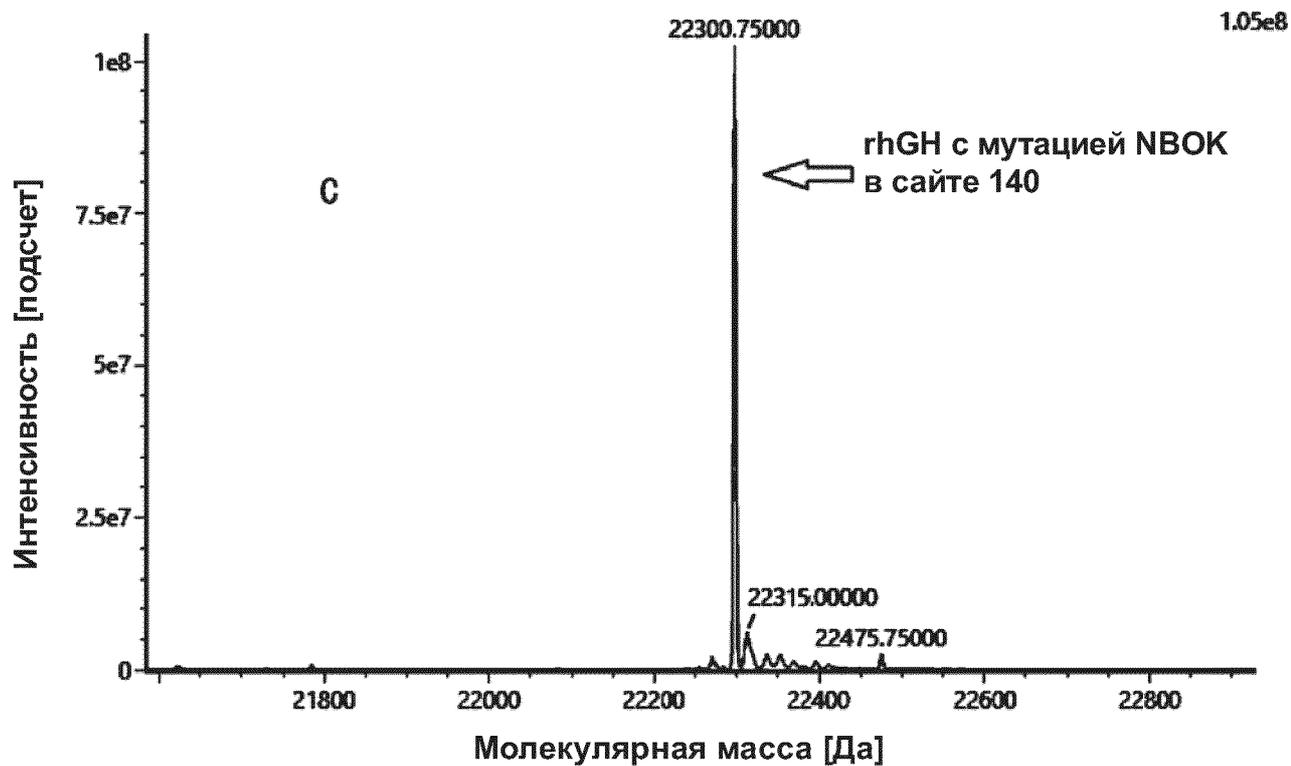
Фиг. 8С



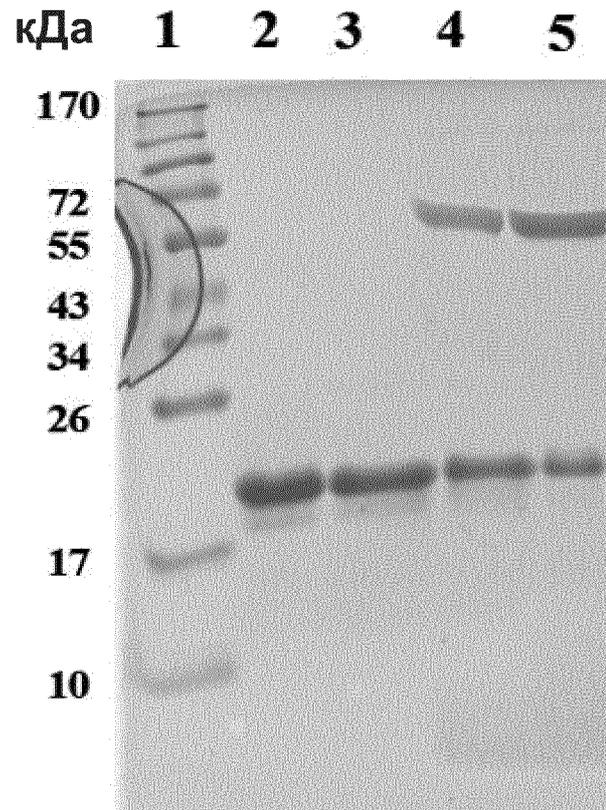
Фиг. 9



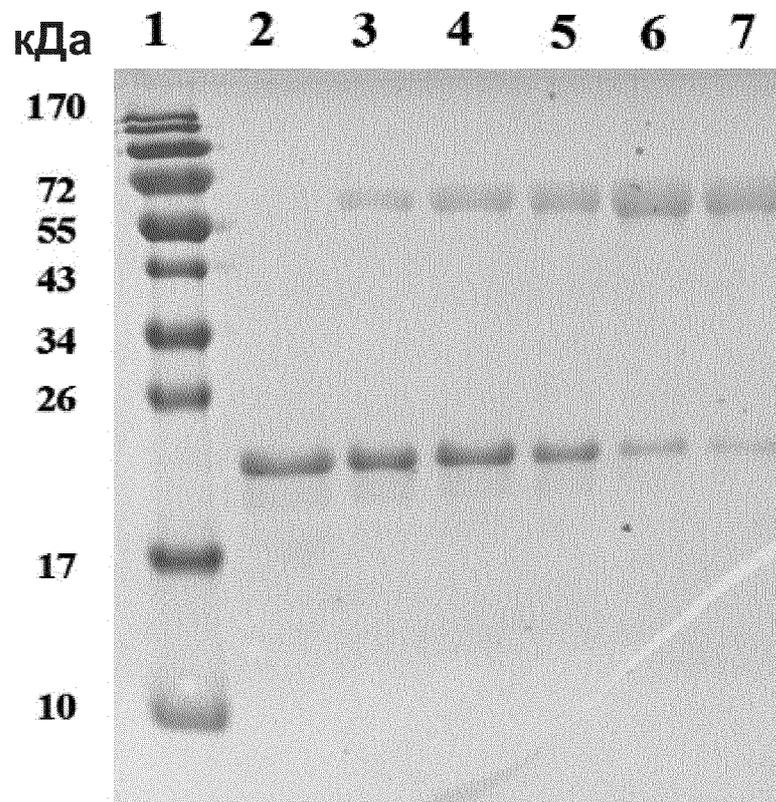
Фиг. 10А



Фиг. 10В



Фиг. 11А



Фиг. 11В